

Diskriminering av gallesalter i luktelappen hos karuss
Carassius carassius

Kurt Bohmann

FORORD

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Institutt for molekylær biovitenskap, program for fysiologi 2004-2005 Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke min veileder Kjell Døving for grundig og god veiledning. Jeg vil også takke Deg Kjell Døving for korrektur av oppgaven. Din hjelp har vært uvurderlig. Kjell har alltid vært hjelpsom og det har vært meget lærerikt å være under hans veiledning. Videre ønsker jeg takke min del veileder Johan B Steen som hjalp meg i min "forrige" oppgave om hundesporing, og alle de personene som stilte opp og deltok i mine forsøk. Karoline lynge, Elin Andersen, Kai Iversen, Tommy Klausen, Thor Ole Trøften, Ronny Iversen, Pål Leontin, Gro Ekeheien og sist men ikke minst Rune Fjellanger som ga meg generell info om hundesporing. Dessverre lot oppgaven om hundesporing ikke seg fullføre, men takk for deres innsats. Takker deg El Hassan Hamdani for god hjelp på labben, med disseksjon og hjelp med generelt oppsett av de elektrofysiologiske metodene. Takk også for nyttige tips til skriving av oppgaven.

Avslutningsvis vil jeg takke alle de blide menneskene som jeg har sittet sammen med på lesesalen, Stine, Mari, Tirill, Christina, Johanne og Rabia. Koselig å bli kjent med dere. ☺

For ikke å glemme; Snappa mi Mai Britt Dahl det godt å ha deg.

– kiss kiss -

Oslo, 29 September 2005

Kurt Bohmann

ad maiorem Dei gloriam

INNHold

FORORD	2
INNHold	3
SAMMENDRAG	5
INNLEDNING	6
Morfologi	6
Lukteepitelet	7
Luktenerven	8
Luktelappen	8
Mitral celler	10
Trakten	11
Lukteorganets diskriminasjon av gallesalter hos karuss	12
Gallesalter	12
Kjemi	12
Gallesalter fester seg i varierende grad på substrat	13
Gallesaltenes utvikling	13
Gallesalter er potente luktstimuli	14
Gallesalter induserer atferdsforandringer	15
Fiskevann og fiskelukt	15
Fiskevandring	15
Gallesalter som feromoner	16
Fiskevann er potente luktstimuli	16
Fiskevann induserer atferdsforandringer	16
Gallesalter i fiskevann	17
Problemstilling	18
MATERIAL OG METODER	18
Karuss	18
Elektrofysiologi	19
Anestesi	19
Disseksjon	19
Registreringer	19
Elektrodene	19
Løsninger	20
Stimuli	20
Preparering av fiskevann	22
Preparering av galle	22
Stimuleringsprosedyre	23
RESULTATER	24
Ulike typer nervøs aktivitet	24
Effekt av stimuli	24
Mitral celler	25
Mansjettceller	26
Spontan aktivitet	27
Spesifikke områder i luktelappen gir svar på gallesalter	27
Nevronenes svar på gallesalter	29
Svar på fiskevann og gallesyrer	30
Effekt av fiskevann og galle	31
Nervøs aktivitet utløst ved ulike konsentrasjoner	32

DISKUSJON	35
Metoder.....	35
Kjemotopi	36
Diskriminasjon av kjente gallesalter.....	36
Diskriminasjon av fiskevann	36
Diskriminasjon av fiskevann og galle	37
Studier av ulike konsentrasjoner.....	37
KONKLUSJON	38
REFERANSER	39

SAMMENDRAG

Det er vist at gallesubstanser er potente luktestimuli og induserer ulike typer adferdsmønstre hos fisk. Det er også flere egenskaper ved gallesaltene som gjør dem spesielt interessante i det akvatiske miljø som eksempel deres kjemiske variasjoner og deres evne til å feste seg til substrater. I denne oppgaven har jeg benyttet ekstracellulær registrering for å se på den nervøse aktiviteten fra enkelte nevroner i luktelappen under stimulering med galle og gallesubstanser. Jeg fant et område i luktelappen i den mediale delen hvor cellene reagerte spesifikt for gallesalten og fiskevann. Jeg studerte den nervøse aktiviteten til nevronene i dette området og fant at nevronene diskriminerte mellom de 4 gallesaltene glykokolsyre (GCA), glykolitokolsyre (GLCA), taurokolsyre (TCA), taurolitokolsyre (TLCA); Nitten prosent av nevronene ble utelukkende eksitert av en av de fire gallesaltene. Videre undersøkte jeg om nevronene reagerte på fiskevann og fant ut fiskevann var mer potent en gallesyrer ved konsentrasjon 10^{-7} M. Min konklusjon er at fiskevann inneholder gallesalter eller substans med gallesaltlignende strukturer. Jeg har gjort forsøk med ulike konsentrasjoner av gallesaltet, glykolitokolsyre og vist at dette gallesaltet gir svar ved 10^{-13} M.

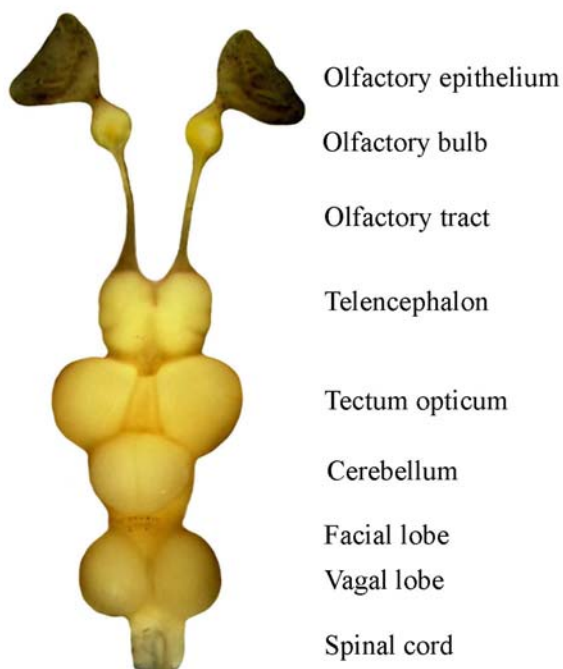
INNLEDNING

For mer enn 20 år siden ble galle og gallesalter vist å være potente luktstimuli for benfisk. Siden har en rekke undersøkelser underbygd tanken på at de er viktige luktstimuli for fisk. I min oppgave har jeg undersøkt i hvilken grad enkeltnevroner i luktelappen hos karuss *Carassius carassius* kan skille mellom ulike gallesalter. Videre om disse nevronene kan skille mellom vann og galle fra ulike fisker.

I innledningen til denne oppgaven beskriver jeg først hvorledes luktesystemet hos karuss er bygget opp. Jeg beskriver så de studier som har vist at galle og gallesalter er potente stimuli. Deretter beskrives gallesaltenes kjemiske egenskaper og deres eventuelle rolle i fiskenes liv.

Morfologi

Fiskens luktesystem er bygget opp anatomisk som vist i Figur 1.



Figur 1: Et bilde av hjernen med luktesystemet til karuss som viser sanseepitel, luktelappen og traktus (Hamdani el, 2003).

Lukteepitelet

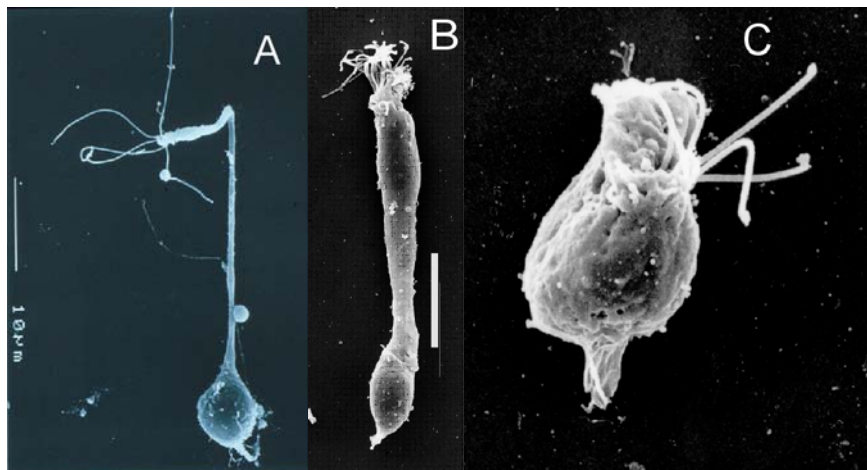
Det perifere luktorganet til karpefisk, sitter på den dorsale delen av nesen, midt mellom snutespiss og øyne. Vann strømmer inn i lukteepitelet via en fremre åpning og ut via en bakre åpning. Hos karuss er lukteepitelet formet som en oval rosett med et antall lameller (Pfeiffer, 1963; Holl, 1965) arrangert fjærformet fra en bindevevsrygg kalt raphe.

På lamellene finner man sansecellene og hos mange arter fisk blant annet torsk og visse karpefisker som for eksempel karpe *Cyprinus carpio*, består hver lamelle av et sensorisk og en ikke-sensorisk epitel som gir en variasjon i distribusjonen (Yamamoto, 1982). Den ikke-sensoriske delen inneholder i hovedsak cilierte støtteceller, gobletceller og epidermale celler. De cilierte støttecellene er sylindriske. Det er antatt at cilienes aktivitet skaper vannstrømmen over lamellene (Døving & Thommesen, 1977) (Sleigh *et al.*, 1988). Gobletcellene er ovale i form og inneholder granula med forskjellige elektronegativ densitet. Gobletceller finnes i hovedsak i det ikke-sensoriske epitel (Breipohl *et al.*, 1973), men er også å lokalisere i de sensoriske delene av lukteepitelet (Hansen *et al.*, 1999).

Tre celletyper har blitt karakterisert i den sensoriske delen av epitelet. Støtteceller, basalceller og reseptorceller. Støttecellene skiller dendrittene til reseptorcellene og har på overflaten mikrovillære utvekster. Basalcellene er små celler og ligger mellom den basale delen av støttecellene og aksonene fra reseptorcellene. Disse cellene har en oval til rund kjerne lokalisert på overkanten av cellen. Man regner med at basalcellene er stamceller for både sansecellene og støttecellene i sanseepitelet.

Sansecellene er primære bipolare nevroner og deres cellesoma er lokalisert i forskjellige dyp i sanseepitelet. Disse strukturene gir sanseepitelet en pseudostratifisering. Det er beskrevet tre morfologiske typer av primære sanseceller

- Sanseceller med lange dendritter og cilier (Ichikawa & Ueda, 1977), der cellesoma ligger dypt i epitelet.
- Sanseceller med intermediære dendritter mikrovilli (Ichikawa & Ueda, 1977; Thommesen, 1983), der cellesoma ligger i de midtre lag av epitelet.
- Sanseceller med korte dendritter kalt kryptceller (Hansen *et al.*, 1997; Hansen & Finger, 2000), som ligger mot sanseepitelets overflate.



Figur 2: Tre morfologisk ulike celletyper. (A) Ciliert sansecelle, (B) mikrovillær sansecelle og (C) kryptcelle.

Luktenerven

Hver sansecelle har et akson som går til luktelappen. Disse aksonene er blant de tynneste som finnes hos vertebrater og har hos lake *Lota lota* en snittediameter på ca 0,14 μm (Gemne & Døving, 1969). Spesielt for disse aksonene er at mange av dem samles innenfor et mesakson. Dette er i kontrast til andre ikke-myeliniserte nerver i kroppen. Samlet danner aksonene luktenerven.

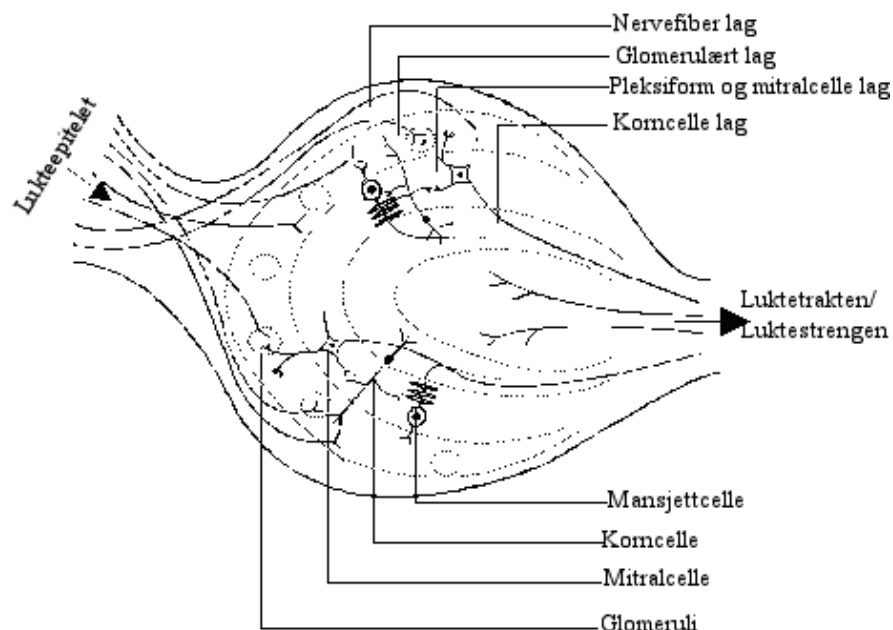
Luktelappen

Hos karuss er luktelappen en eggformet struktur 1,1 mm lang og 0,9 mm bred. Den er lokalisert nær lukteepitelet slik at luktenerven er kort; og koblet til hjernen med lukstrenger. Luktelappen kan deles i 4 konsentriske lag (Figur 3), som fra ytterst til innerst er:

- Nervefiberlag som består av sansecellenes aksoner.
- Glomerulærlag som inneholder glomeruli dvs. synapsene mellom sansecellene og ulike sekundære nevroner.
- Pleksiform og mitralcellelag som inneholder sekundære nevroner.
- Korncellelag som bl.a. inneholder kornceller.

Luktelappen er første reléstasjon i luktesystemet og ble først beskrevet i detalj av Sheldon (1912) i 1912. Luktelappen mottar informasjon fra sansecellene og sender den videre til høyere senter i hjernen via sekundære nevroner (Retzius, 1894). Luktelappen mottar også

informasjon fra hjernen. Luktelappene er forbundet med hverandre via fibre i traktus (Døving & Gemne, 1966).



Figur 3: En skjematisk tegning av en horisontal seksjon av luktelappen hos karuss.

Tegningen viser de fire forskjellige lagene og den nervøse organisasjonen. Den strippede linjen antyder skillet mellom lagene. Tegningen er fra Hamdani (2000).

I glomerulus finne man synapsene mellom de primære sansecellene og sekundære nevronene. Histologisk er glomeruli distinkte enheter som ikke er særegent hos vertebrater, men finnes også i luktesystemet til andre grupper som for eksempel mollusker og artropoder (Hildebrand & Shepherd, 1997). Hos gnagere, mottar en glomerulus input fra en populasjon av sanseceller som alle uttrykker den samme luktreseptorer (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998).

Friedrich og Korsching (1997) merket aksonene i luktelappen hos sebrafisk med en Ca-indikator og målte aktiviteten optisk. Deres resultater viste at subregioner, som sannsynligvis representerte glomeruli, i hovedsak ble aktivert av spesielle definerte kjemiske stimuli.

Morfologiske studier av Holmgren (1920) viste at det var forskjellige typer av sekundære nevroner i luktelappen, periglomerulære celler og mitral celler. Andre celletyper i luktelappen er, perinestceller, miksede synapseceller og kornceller (Kosaka & Hama, 1982).

En spesiell type av internevrone som kalles mansjettceller finnes også i luktelappen (Kosaka & Hama, 1979; Kosaka, 1980; Kosaka & Hama, 1981; Alonso *et al.*, 1987; Arevalo

et al., 1991). Disse cellene er større enn mitralceller og er lokalisert i pleksiform og mitralcellelaget. Hver av disse cellene har en sfærisk cellekropp på ca 12-20 μm i diameter og den første delen av aksonet har mansjettformete utløpere. Det spesielle med mansjettcellene er alle de synapsene som de danner med kornceller. Det er antydning at hver mansjettcelle danner synapser med 1000 til 2000 kornceller (Kosaka & Hama, 1979; Kosaka, 1980). Det er uvisst hvilken funksjon denne celletypen fyller, men det har blitt vist at de har aksoner som går ut i traktus (Hamdani el & Døving, 2003).

Mitral celler

Histologiske studier av Sheldon (1912) og Holmgren (1920) viste at beinfiskenes mitralceller er store nevroner som er jevnt fordelt i mitralcellelaget og det var tidligere antatt at mitralcellene var de eneste reléneuronene fra luktelappen til høyere senter i hjernen via traktus (Sheldon, 1912; Finger, 1975; Northcutt & Davis, 1983; von Bartheld *et al.*, 1984; Rooney *et al.*, 1992).

To typer mitralceller er identifisert hos beinfisk med utgangspunkt i deres morfologi (Alonso *et al.*, 1988). Type I mitralceller er fusiforme og har en triangulær cellekropp (Figur 4). De har ofte 2 eller flere dendritter forgrenet, der avstandene mellom dem kan være ganske store. Det er denne celletypen man har regnet med er den karakteristiske beinfisk-mitralcelletypen og Alonso og medarbeidere (Alonso *et al.*, 1988) antar at de dominerer i den mediale delen av bulben. Type II mitralceller, er runde og ovale og har i kontrast til type I mitralcelle som oftest bare en dendritt som er forgrenet til hverandre. Denne celletypen ligner mer på den man finner hos pattedyr. Denne celletypen er i hovedsak lokalisert i den laterale delen av luktelappen og projiserer mest sannsynlig til telencephalon gjennom den laterale trakten.



Figur 4: Eksempel av en mitral celle lokalisert i den mediale delen av luktelappen (Alonso *et al.*, 1988).

Trakten

Koblingen mellom luktelappen og hjernen går igjennom en rekke distinkte bunter, kalt trakten, som projiserer til ulike deler av telencephalon. I luktesystemet til karuss kan trakten deles i lateralis (LOT), den laterale delen av medialis (IMOT), og den mediale delen av medialis (mMOT).

I tidligere studier har man farget cellene med et lipofilt fargestoff kalt DiI, og vist hvilke typer sanseceller som er knyttet til de ulike delene av trakten. Dette sammen med atferdstudier som viser at hver enkelt bunt av trakten formidler en bestemt type atferd gjør det mulig å kople opp anatomen med funksjon. Når DiI blir plassert i den laterale delen av luktelappen farges sanseceller med intermediære dendritter og mikrovilli, samtidig farges aksoner i LOT (Hamdani *et al.*, 2001a). Denne delen av trakten formidler matsøksatferd hos karuss (Hamdani *et al.*, 2001b).

Når DiI blir plassert i den ventrale delen av luktelappen farges sanseceller med korte dendritter og cilier, samtidig farges aksoner i IMOT. Denne delen av trakten formidler reproduktiv atferd (Weltzien *et al.*, 2003).

Når DiI blir plassert i den mediale delen av bulben farges sanseceller med lange dendritter og cilier, samtidig farges aksoner i mMOT (Hamdani *et al.*, 2002). Denne delen av trakten formidler alarmreaksjon hos karuss (Hamdani *et al.*, 2000).

Lukteorganets diskriminasjon av gallesalter hos karuss

Gallesalter

Gallesalter hos vertebrater fungerer som emulgatorer av fett i tarmen og er essensielle i absorpsjon av fett fra tarmen til blodet. Gallesyrer er steroider som konjugert med aminosyrene glysin eller taurin danner gallesalter. Deres effekt som emulgatorer skjer ved at de har en hydrofil og en lipofil side og former miceller av fett. Syntesen av gallesalter er mekanismen for nedbrytning av kolesterol i kroppen. Hver dag blir ca 500 mg av kolesterol omdannet til gallesalter. Mer en 85 % av gallesaltene blir reabsorbert i tarmen og opprettholder en kolesterol homøostase, hvilket igjen vil si at hvert gallemolekyl i snitt blir gjenbrukt ca 20 ganger. Det er flere egenskaper ved gallesaltene som gjør dem spesielt interessante i det akvatiske miljø.

- De varierer i kjemisk sammensetning
- De har evne til å feste seg til substrater
- De har utviklet seg hos forskjellige arter
- De er særdeles potente luktstimuli
- De induserer atferdsforandringer
- De kan muligens medvirke i fiskevandring

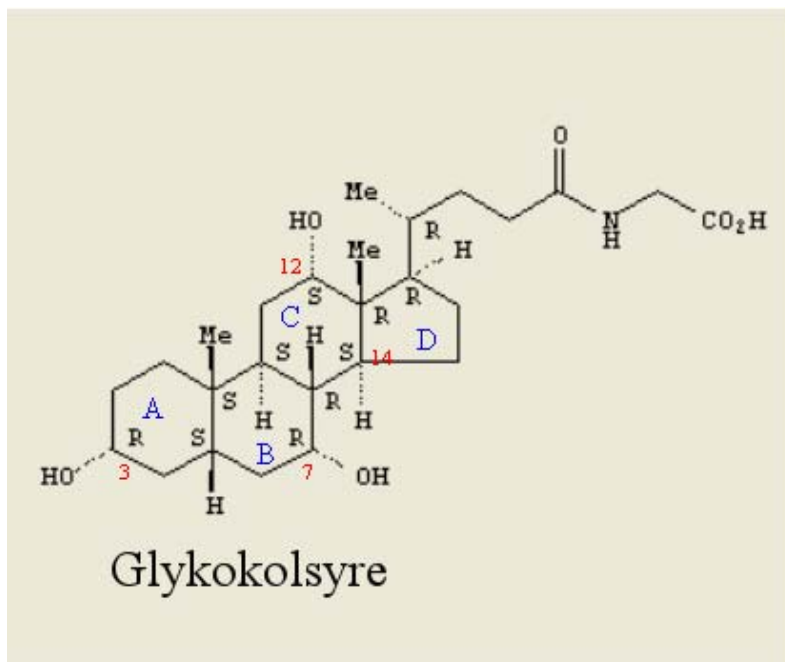
Man kan tenke seg at ulike gallesalter har ulike funksjoner avhengig av deres egenskaper i henhold på alle disse egenskapene.

Kjemi

Alle gallesyrer består av 2 koblede enheter, en rigid steroid kjerne og en kort alifatisk sidekjede (Hofmann, 1999), figur 5. Den stereoide kjernen av gallesyren har ett mett tetrasyklisk hydrokarbon perhydrosyklopentanophenantrene bestående av 3 hexamerer (A, B og C) og en pentamer (D). I tillegg er det en angulær metylgruppe koblet i posisjon C18 og C19. Hos høyere vertebrater er også gallesyrens kjerne kurvet på grunn av A og B ringene som er i en cis-formet konfigurasjon. Strukturforskjellene påvirker gallesyrenes egenskaper både morfologisk og fysiologisk og sidekjeden til gallesyren bestemmer klassen til komponenten, om det er gallesyre eller gallealkohol. Det finnes 4 typer gallealkoholer, C27, C26, C25 og C24, men disse finnes i liten grad i utviklet livsform. Det finnes videre 2 hovedtyper av gallesyrer, og disse blir formet fra lengden på sidekjeden C27 og C24. Hos høyere vertebrater er hoveddelen av gallesyrer C24.

Gallesyrer har en diverse struktur. I hovedsak kan man si at gallesyrer varierer kjemisk ved 3 aspekter.

- Sidekjedestrukturen
- Stereokonfigurasjonen til A/B ringene
- Fordeling, antall posisjoner og stereokjemi til hydroksylgruppene.



Figur 5: Glykokolsyre, figuren markerer de generelle trekkene ved en gallesyre. Nummerering av karbon er delvis merket for å letteliggjøre telling.

Gallesalter fester seg i varierende grad på substrat

Gallesalter fester seg til substrat i vann. Adhesjonen er sterkt varierende med konfigurasjon og kjemisk sammensetning. Likeledes varierer frigjøringen fra substratet. Nedbrytningen vil vesentlig bero på det mikrobielle miljøet i vannet, temperatur og lysforhold.

Gallesaltenes utvikling

Hvorledes gallesalter varierer blant vertebratene har blitt inngående diskutert av Haslewood (1967a). Han poengterte hvordan gallesaltene har utviklet seg fra C27 α alkohol sulfater til C27 syrer til C24 β syrer. Hos vertebrater har gallesalter vist en enorm diversitet mellom artene (Hagey, 1992; Hofmann, 1995) og selv innenfor hver familie har det blitt vist store variasjoner. Hos salamander *Salamandra salamandra* er det påvist en høy konsentrasjon av

taurinkonjugert gallesalt (Haslewood, 1967b). I motsetning har salamander giganten *Megalobatrachus japonicus*, 5 α og C27 3-hydroksy gallesyrer og alkoholiske gallesyrer (Haslewood, 1967b). Andre arter som for eksempel rotter og mus, har lignende gallesyreprofiler, men benytter forskjellige primær gallesyrer.

Tabell 1: Forskjellige gallesyrer hos vertebrater (Krasowski *et al.*, 2005)

Species	Predominant biliary bile salts	Conjugation (major) ^a
Human	Cholic acid (3 α ,7 α ,12 α) ^b Chenodeoxycholic acid (3 α , 7 α) Deoxycholic acid (3 α ,12 α) ^{b,c} Lithocholic acid (3 α) ^{b,c}	Taurine Glycine
Mouse	β -Muricholic acid (3 α ,6 β ,7 β) ^b Cholic acid ω -Muricholic acid (3 α ,6 α ,7 β) ^b Murideoxycholic acid (3 α ,6 β) ^c Lithocholic acid ^c	Taurine
Rat	α -Muricholic acid (3 α ,6 β ,7 α) ^b Cholic acid ω -Muricholic acid Murideoxycholic acid ^c Lithocholic acid ^c	Taurine
Rabbit	Deoxycholic acid ^c (~95%) Cholic acid Lithocholic acid ^c	Glycine
Chicken	Chenodeoxycholic acid Cholic acid 5 α -(Allo)cholic acid (3 α ,7 α ,12 α) ^b Lithocholic acid ^c	Taurine
Frog (<i>Xenopus laevis</i>)	C ₂₇ bile acid ^d C ₂₇ tetra- and penta-hydroxylated bile alcohols	Taurine Sulfate
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	C ₂₇ bile alcohol (5 α -cyprinol) ^e	Sulfate
Sea lamprey (<i>Petromyzon marinus</i>)	C ₂₄ bile alcohol (5 α -petromyzonol) ^f	Sulfate

Gallesalter er potente luktstimuli

Gallesubstanser ble oppdaget å være potente luktestimuli for fisk av Døving og medarbeidere (1980) og Thommesen (1982; 1983). Ut fra registreringer fra luktelappens overflate på laksefisk under stimulering med gallesalter og aminosyrer kunne man vise at gallesaltene var ca. 1000 ganger mer potent enn aminosyrene, samtidig som det var en klar segregasjon av svarene på overflaten av luktelappen slik at aminosyrene ga svar i den laterale delen av luktelappen, mens gallesaltene ga svar i den mediale delen (Døving *et al.*, 1980).

Gallesalter induserer atferdsforandringer

Det er vist at gallesyrer induserer ulike typer adferdsmønstre hos røye. Eksempler på dette er, snapping og retningsorientering (Hellstrom & Døving, 1986). Det er videre vist at voksne *Salvelinus alpinus* L. tiltrekkes av urinen fra andre laksefisk (Olsén, 1987) og tarmekstrakt tiltrekker atlantiske lakseunger *Salmo salar* L. (Stabell, 1986) (Olsén, 1987). Nylig er det vist at gallesyrer for laks *Salvelinus namaycush* er sterkt påvirket av sex og modningstadiet (Zhang *et al.*, 2001) og at gallen til hunn regnbueørret *Oncorhynchus mykiss* inneholder feromoner (Vermeirssen & Scott, 2001). En spesifikk gallesyre har ikke blitt identifisert som et feromon hos beinfisk.

Det er vist at sjøniøye *Petromyzon marinus* i ulike deler av livet utskiller forskjellige gallesyrer som induserer karakteristiske adferdsmønstre hos voksne fisk (Bjerselius *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). Sjøniøye som larver vokser opp i små elver og innsjøer, deretter vandrer de ut i havet, for i siste stadium å returnere til innsjøene for å gyte (Hardisty & Potter, 1971). Larvene til sjøniøye avgir 2 gallesyrer, *petromyzonol sulfate* og *allocholic syre* (Haslewood & Tokes, 1969; Li *et al.*, 1995; Polkinghorne *et al.*, 2001) som er potente luktstimuli (Li *et al.*, 1995; Li & Sørensen, 1997) og virker som attraktanter. Denne adferden er vist hos voksne sjøniøye som kunne velge mellom 2 labyrinter med hvert sitt vann (Bjerselius *et al.*, 2000; Vrieze & Sorensen, 2001). Det er videre vist at voksne hanner avgir gallesyrene *3-keto petromyzonol sulfate* (Li *et al.*, 2002) og *3 keto allocholic syre* (Yun *et al.*, 2003) etter spermieutløsning. Den første av disse gallesyrene har vist å øke svømmeaktiviteten hos hunner med eggløsning samtidig som den har virket sterkt attrakterende på hunnene. (Li *et al.*, 2002). Funksjonen til den sistnevnte gallesyren er uvisst, men man antar at den er en mindre komponent i de hannlige feromonene (Yun *et al.*, 2003).

Fiskevann og fiskelukt

Fiskevandring

Laksens vandring ble beskrevet av Clausøn Friis (1599) sent på 1500 tallet. Nesten 400 år senere ble det antatt at luktesansen kan ha betydning for riktig tilbakekomst ved fiskevandring (Wisby, 1954; Groves, 1968). Hasler og Nordeng var pionerene som la frem hypoteser for tilbakevandringen hos fisk. Hasler (1968; 1978) foreslo at riktig tilbakevandring var basert på gjenkjenning av substanser fra planter og mineraler, mens Nordeng (1971; 1977) noe senere

foreslo at feromoner kunne medvirke som potent veivisere i tilbakevandringen. Nordengs hypotese beskrev en arvelig respons hvor de adulte fiskene følger en sti av luktspor. Denne stien ble dannet når unge småfisk i samme populasjon, svømte ut til næringsområdene i havet.

Hvis man antok at Nordengs veiviserhypotese var korrekt, kunne man stille seg følgende spørsmål som nedenfor forsøkes å besvares:

- Hvor dannes feromonene?
- Skilles feromonene ut i fiskens vann?
- Er fiskevann i så fall, et potent lukststimulerende middel?
- Induserer fiskens vann atferdsforandringer hos fisken?

Gallesalter som feromoner

Elektrofysiologiske forsøk fra 1973 har lagt til grunn at det finnes substanser som er potente for luktorganet som kommer fra laksefisken (Døving *et al.*, 1973). Det er videre vist at det finnes en neural basis for diskriminering av fiskearter (Døving *et al.*, 1974). Feromonene som Nordeng foreslo, kan derfor antas å være gallesalter som kommer fra fiskene. Selset og Døving (1980) har vist at fisk produserer substanser som tiltrekker de voksne individer under migrasjonstiden. Dersom feromonene skilles ut i vannet, vil det være naturlig at fiskevann er potent som lukststimulerende middel.

Fiskevann er potente lukststimuli

Forsøk av Thommesen (1978) viste at fiskevann induserte svar fra luktelappen hos røye *Salmo alpinus L.* og at de har ga størst svar i den rostrale og mediale delen av luktelappen. Analoge studier med gallesalter gjort av Døving *et al.* (1980) forsøkte å finne de basale stoffene i fiskevannet. Med DC-registreringer fra luktelappen hos røye og harr *Thymallus thymallus L.*, benyttet de gallesyrer og aminosyrer som stimuli. Aminosyrene og gallesyrene ga svar i forskjellige områder i luktelappen. Gallesyrene viste en neural respons på den mediale delen av luktelappen, mens aminosyrene i hovedsak ga svar i den laterale delen av luktelappen.

Fiskevann induserer atferdsforandringer

Senere studier gjort av Stabell og kolleger har vist hvordan laks *Salmo Salar L.* markerer og diskriminerer lukt fra andre fisk. I forsøkene plasserte de fisk i oppbevaringstanker og

stimulert med fiskevann fra andre tanker. Etter stimuli studerte de responsen på testfiskene. De observerte at testfiskene ble tiltrukket til tankvann hvor fisk med beslektet individer tidligere var blitt holdt fanget. I mindre grad ble fiskene også tiltrukket vann fra andre fisker av egen art (Stabell, 1986).

Gallesalter i fiskevann

Tidligere forsøk har altså vist at fiskevann induserer atferd hos fisk, at fiskevann virker luktstimulerende og at det i samme responsområde finnes reseptorer som kan stimuleres av gallesalter. Fiskene avgir sekret til vannet, og fiskens sekreter inkludert urinen virker atferdsfremmende for andre fisk. Disse resultater peker på at *det* eller *de* aktive stoffene i fiskevannet kan være en gallesyre eller ha en gallelignende struktur. Det er til dags dato ikke beskrevet den kjemiske naturen til disse atferds/luktstimulerende stoffene hos beinfisk, men det er gjort en rekke studier med hensyn på å diskriminere mellom populasjons spesifikke og artsspesifikke feromoner (Døving *et al.*, 1980; Selset & Døving, 1980; Stabell, 1982; Olsén, 1987). Ingen av disse feromonene har enda blitt fullstendig kjemisk identifisert, men studier på havniøye *Petromyzon marinus* har vist at larven produserer 2 unike gallesyrer allocholic syre og petromyzonol sulfat (Li *et al.*, 1995) og det er vist at havniøye er luktsensitiv til de spesifikke gallesyrene under migreringen (Li *et al.*, 1995).

Hos beinfisk har det blitt funnet ut at de primære gallesalter er sulfatert gallealkohol, hovedsakelig 5-cyprinol og 5-chimaerol, C₂₄ gallesyrer hovedsakelig kolsyre, chenododexycol syre, deoxycol syre og haemulchol syre (Haslewood, 1967b, 1978), taurinmerdiert, sulfatert eller glycine merdiert. (Denton *et al.*, 1974). I nyere tider har også cysteinolsyremerdiert gallesalt blitt funnet i galle fra noen marine arter (Une *et al.*, 1991). En slik variert gruppe gallesalter i fisk kan igjen lede til økt forskjell i gallesyresluttproduktet i vannet.

Problemstilling

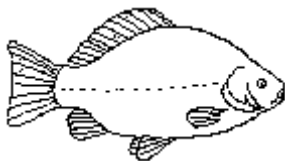
Med bakgrunn i de resultatene som er beskrevet ovenfor, kan man stille følgende problemstillinger:

1. Finnes det spesifikke områder i luktelappen som gir svar på gallesalter?
2. Kan nevroner i luktelappen hos karuss diskriminere mellom fire ulike gallesalter?
3. Utløser fiskevann svar i de samme nevronene som reagerer på de fire gallesaltene?
4. Er fiskevann mer potent enn de 4 gallesaltene
5. Induserer fiskevann og galle fra samme fisk lignende svar i nevronene i luktelappen?

MATERIAL OG METODER

Karuss

Karuss (*Carassius carassius L*) ble fanget in i Tjernsrud i Bærum og transportert til tanker til Akvarieavdelingen ved Institutt av molekylær biovitenskap. Fiskene veide mellom 15-30 g. Jeg brukte 20 karuss til de elektrofysiologiske forsøkene.



Figur 6: Karuss

Elektrofysiologi

Anestesi

Stokkløsningen av benzokain var 10 g i 200 ml 96 % etanol og fiskene ble anestesert med 5ml benzokain i en bøtte med ca 3 liter vann. Etter ca 5 minutter i benzokainløsningen ble fiskene bedøvet med ca 0, 2ml Saffan bestående av 0,9 % alphaxalon og 0,3 % alphadolon konsentrasjon. Saffan stimulerer hjerteaktiviteten og dilaterer blodårene i hjernen. Virkningen varer i flere timer. Saffan induserer anestesi i sentralnervesystemet og påvirker ikke det sensoriske system.

For å unngå at fisken tørket ut og beveget seg under forsøket, ble den lagt i fuktet papir og plassert i en holder av plastisk gips. Fisken ble festet med 2 bolter mot øvre del av øyehulen. Jeg forsikret meg om at lukteepitelet ikke ble skadet og at åpningene til rosetten var åpne og tilgjengelige under denne prosedyren. Fisken fikk vann over gjellene med en slange i munnen. Ved avslutning av forsøket ble fisken dekapitert og fryst for bruk i andre forsøk.

Disseksjon

Skinnet og skalletaket over den høyre luktelappen ble fjernet med en benstanse. Det mesenchymale bindevevet ble fjernet med cellostoff slik at det var fri adgang til luktelappen. Denne delen av hjernen ble dekket med parafinolje, som hindret uttørking. Jeg kontrollerte at blodstrømmen til luktelappen var god ved å se på blodgjennomstrømmingen i årer som ligger langs trakten.

Registreringer

Elektrodenene.

Elektrodenene ble laget av wolfram, tungstentråd ($d = 125 \mu\text{m}$). Tråden ble rettet ut ved å gløde og strekke den over en gassflamme. Seks cm lange biter av tråden ble etset i mettet løsning av kaliumnitritt ved en spenning på 6 V AC. Etter spissing ble elektroden vasket med etanol.

Elektrodenene ble isolert med lakk ved å dyppe den i lakk med spissen opp. Mellom 50-200 μm av elektrodespissen var uisolert. En god elektrode ga lite støy og registrerte nerveimpulser fra en enkelt celle, en ”dårlig” elektrode gjorde det mulig å registrere fra flere nevroner samtidig, men den ga også mer støy. Denne type elektroder er relativt enkle å lage (Hubel, 1957) og har

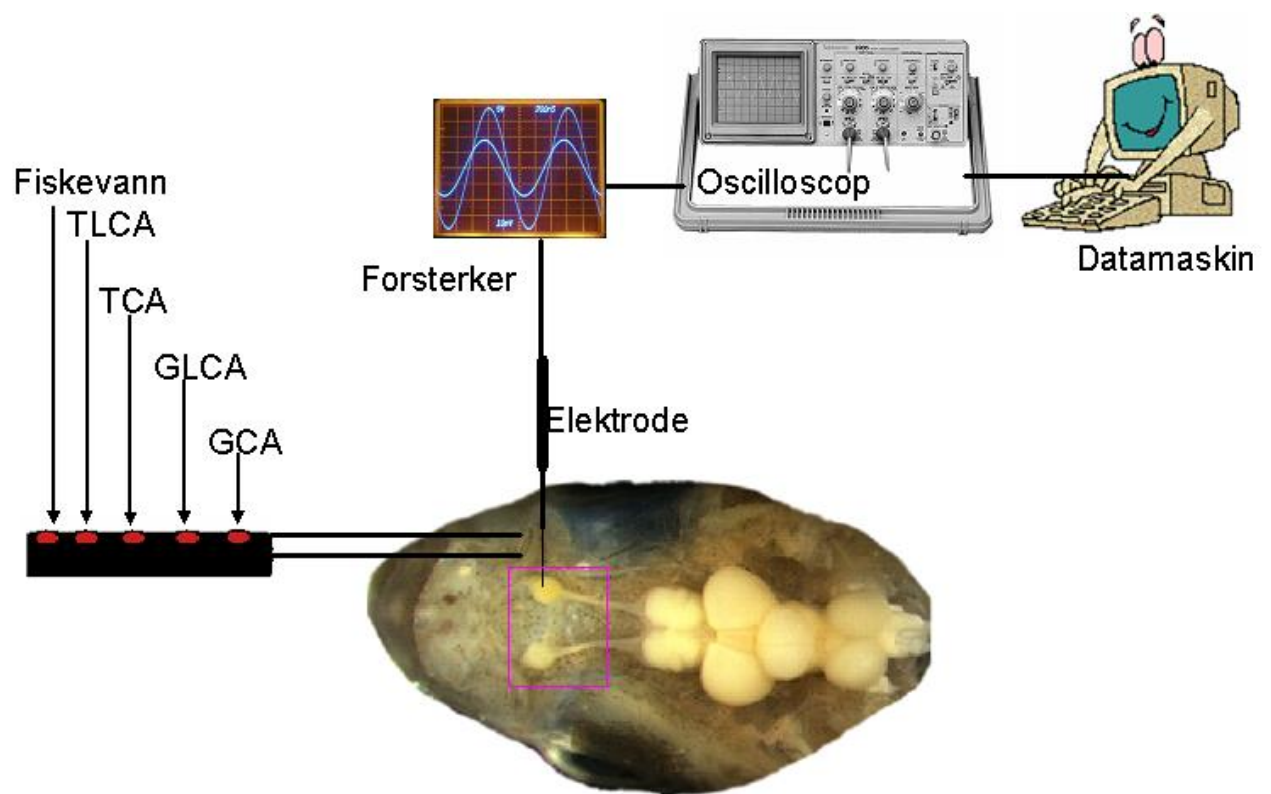
blitt benyttet i en rekke studier av nervøs aktivitet (Hubel & Wiesel, 1962). Ved forsøk ble elektrodene festet i en holder og koblet til en forsterker (Warner Instrument Corp. DP-301). Filterbegrensingene var 0,3-3 kHz og et 50 Hz linjefilter ble aktivert når det var nødvendig. Justering og posisjonering av elektroden i forhold til bulben, ble utført med en mikromanipulator (SD Instruments MC 1000). Referanseelektroden ble plassert på fiskens hode nær disseksjonsåpningen. Signalet fra forsterkeren ble vist på et oscilloskop (Textronix, dual beam, RM565). I noen av forsøkene ble det benyttet en audioforsterker for å høre den nervøse aktiviteten. Signalet ble overført til en datamaskin PC (Dell Optiplex GX1p) via en analog til digital konverter (CED μ 1401). På denne maskinen ble aktiviteten observert og lagret til disk, med et softwareprogram Spike 3.0 (CED). Dette programmet registrerte også stimuleringsperioden.

Løsninger

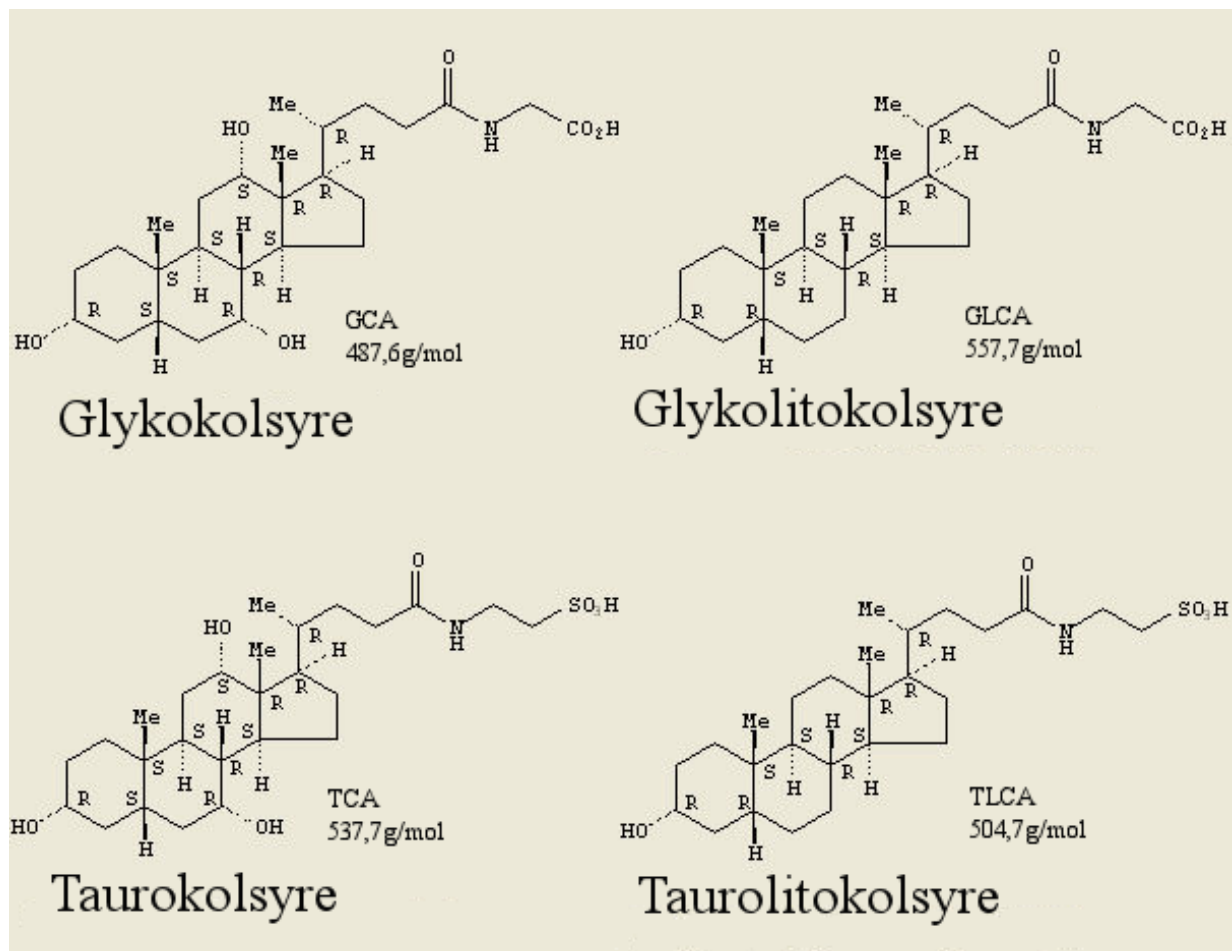
Kunstig ferskvann ble laget av 29 mg/L NaCl, 3,7 mg/L, 58 mg/L CaCl_2 og 16 mg/L NaHCO_3

Stimuli.

I mitt arbeid har jeg benyttet 4 gallesalter, fiskevann og fiskegalle som stimuli. Gallesaltene som ble benyttet var Taurolitokolsyre (TLCA), Taurokolsyre (TCA), Glykolitokolsyre (GLCA) og Glykokolsyre (GCA). De 4 gallesaltene blei veid opp og fortynnet med 3ml Dimethyl Sulfoksid (DMSO) til en stokkløsning som hadde en konsentrasjon på 10^{-3} M. Fra denne stokkløsningen ble det videre fortynnet til 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} og 10^{-13} M med kunstig ferskvann. Konsentrasjonene fra 10^{-7} til 10^{-13} M ble benyttet under forsøkene. En konsentrasjon på 10^{-7} M er benyttet i alle forsøkene hvor annet ikke er spesifisert.



Figur 7: Skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet.



Figur 8: Gallesyrener benyttet som stimuli under forsøkene.

Preparing av fiskevann

To fisk ble plassert i hvert sitt kar. Karene ble etter generell vask, grundig rengjort, rensset med metanol og på ny skyllet med destillert vann. Metanol løser opp gallesalter og var derfor benyttet som løsemiddel for å fjerne eventuelle spor av galle. Karet ble fylt med 10 liter kunstig ferskvann. Vannet var laget tidligere på dagen og luftet. Etter 24 timer ble fiskene tatt opp av karet og dekapitert, og galleblæren fjernet. Vann fra akvariet ble samlet opp i sterile plastrør. Dette vannet fikk navnet "fiskevann" og ble benyttet som stimuli.

Preparering av galle

Galleblærene tatt fra de to fiskene som var benyttet for å lage fiskevann ble dissekert ut og veid. Gallen ble veid opp og fortynnet som i vist i Tabell 2.

Tabell 2: Stokkløsning med galle tatt fra fisk 1 og fisk 2.

	Fisk 1	Fisk 2
Galle	0,0204 g	0,0109 g
APW	2,04 ml	1,09 ml
Konsentrasjon	10 mg/ml	10 mg/ml

Stimuleringsprosedyre

Lukteorganet på høyre side ble kontinuerlig tilført kunstig ferskvann via et polyethylenslange, med en gjennomstrømmingshastighet på $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Stimulering med luktestoff skjedde ved åpning av en ventil til en beholder av stimulusløsning. Vannstrømmen for hvert stimulus ble justert slik at den var lik vannstrømmen med ferskvann. Kun et stimulus ble applisert om gangen. Lukteepitelet ble stimulert på nytt når all spontantaktivitet hadde kommet tilbake til sitt originale nivå, rundt 30 s. Ventilene for de ulike stimuli var arrangert i serie. Det tok derfor kortere tid før væsken fra den første ventilen nådde lukteepitelet enn væsken fra den fjerde ventilen. Dette er det tatt hensyn til ved analysen av svarene på stimulering med de ulike substansene. Væskestrømmen var imidlertid den samme for alle fire ventilene.

RESULTATER

Nervøs aktivitet ble registrert med mikroelektroder i 163 penetrasjoner, vesentlig fra den mediale delen av høyre luktelappen hos karuss. I hver penetrasjonstrasé ble det gjort registreringer fra flere steder i ulike dyp. Totalt ble det gjort registreringer fra 367 posisjoner i luktelappen til 18 karuss. De 74 første registreringene ble foretatt med hensyn på lokalisasjon og det ble benyttet 3 karuss utelukkende til dette formål. Videre ble 9 karuss benyttet til stimuli med 4 gallesalter, GCA, GLCA, TCA og TLCA. En fisk ble benyttet til stimuli med GLCA, TCA, TLCA og fiskevann og deretter GCA, GLCA, TCA og fiskevann som stimuli. Tre karuss ble benyttet til forsøk med ulike konsentrasjoner, 1 karuss ble benyttet til forsøk med to fiskevann og 1 karuss ble benyttet til forsøk med fiskevann og galle. To karuss ble benyttet til tillaging av fiskevann og uttak av galle. Totalt 20 karuss ble benyttet under mine eksperimenter.

Ulike typer nervøs aktivitet

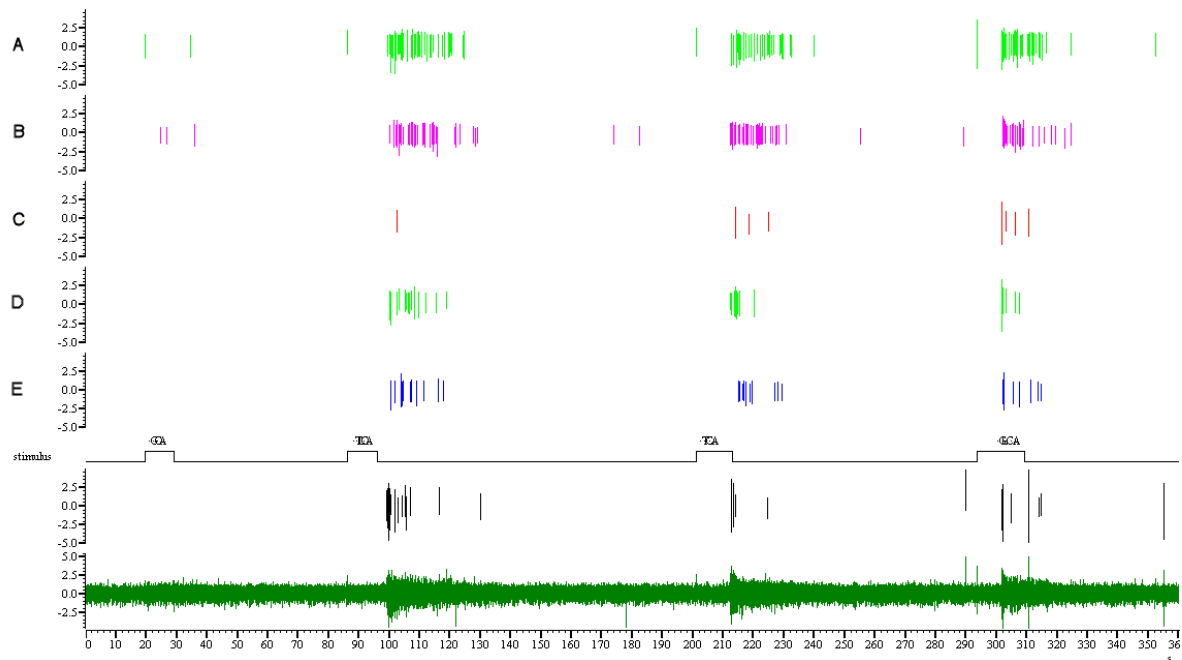
De enheter som man antar stammer fra mansjettceller har relativt større amplitude enn de enhetene som antas stammer fra mitralcellene. Varigheten av aksjonspotensialet er også lengre enn de som observeres fra mitralcellene. Dessuten følges aksjonspotensialet fra disse enhetene av en langsom monofasisk potensialforandring ca 18 ms etter aksjonspotensialet. Dette potensialet har relativt stor variasjon i amplitude. Koplingen mellom de elektrofysiologiske egenskapene til de ulike enhetene med det som er kjent fra anatomen ble første gang foreslått av Zippel og medarbeidere (1999) (Figur 12).

Effekt av stimuli

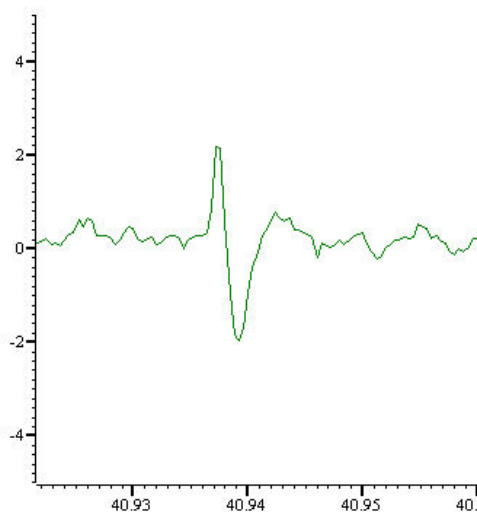
Stimuleringen av lukteepitel førte i hovedsak til en økning av nervøs aktivitet i luktelappen i type I nevroner. I enkelte av tilfellene førte stimuleringen til en inhibering. I disse tilfellene har det antagelig vært kontakt med type II nevroner (mansjettceller). Svarene til luktelappen varierte med konsentrasjonen av stimuli. Ved stimulering med høy konsentrasjon ble det utløst en salve av nervøs aktivitet med høy frekvens. Stimulering med lavere konsentrasjoner ga en mindre nervøs aktivitet.

Mitral celler

Mitralceller er som nevnt i innledningen karakterisert ved en liten amplitude av det bifasiske aksjonspotensialet med en kort varighet på ca.5 ms. Figur 10 viser hvordan mitralceller fra den mediale delen av luktelappen fyrer og hvordan aksjonspotensialet til mitralcellen ser ut, Figur 11 viser hvordan neuronene svarer etter stimuli og hvordan analysen av dette ser ut i Spike.



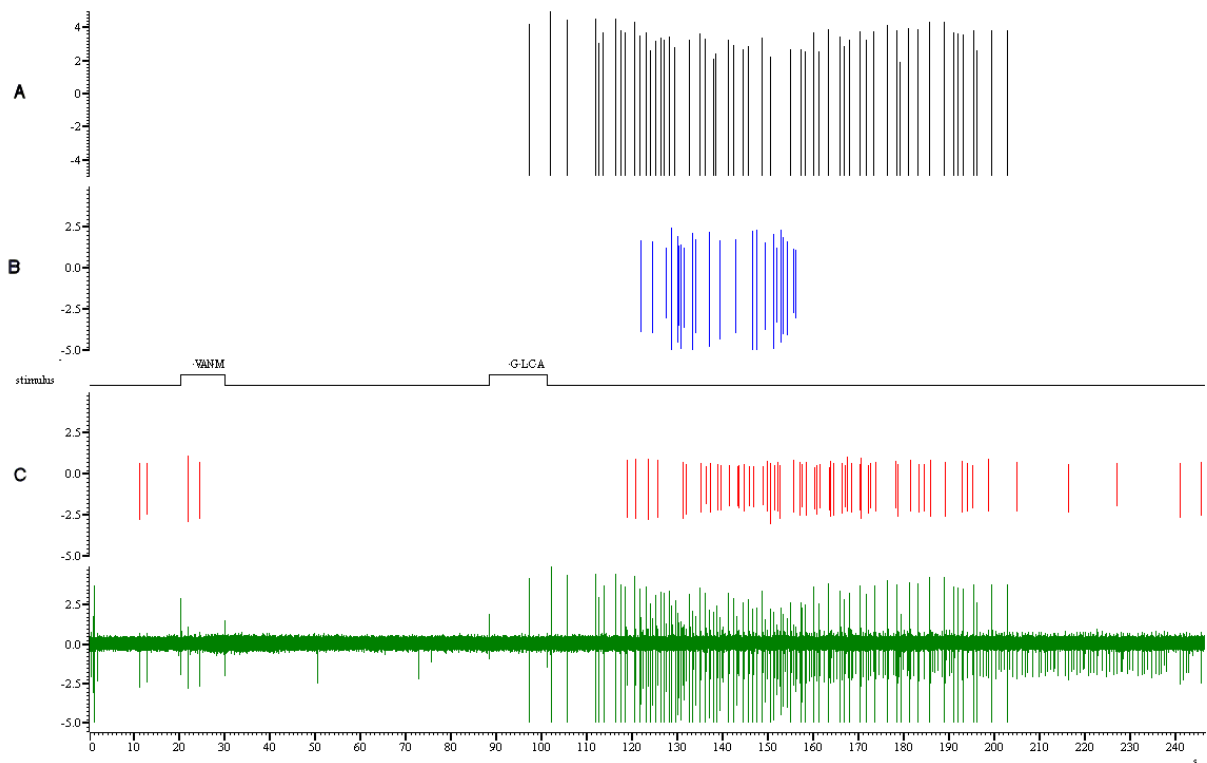
Figur 9: Hvordan mitralceller svarer på stimuli. Stimuleringsrekkefølgen er GCA, TLCA, TCA og GLCA.



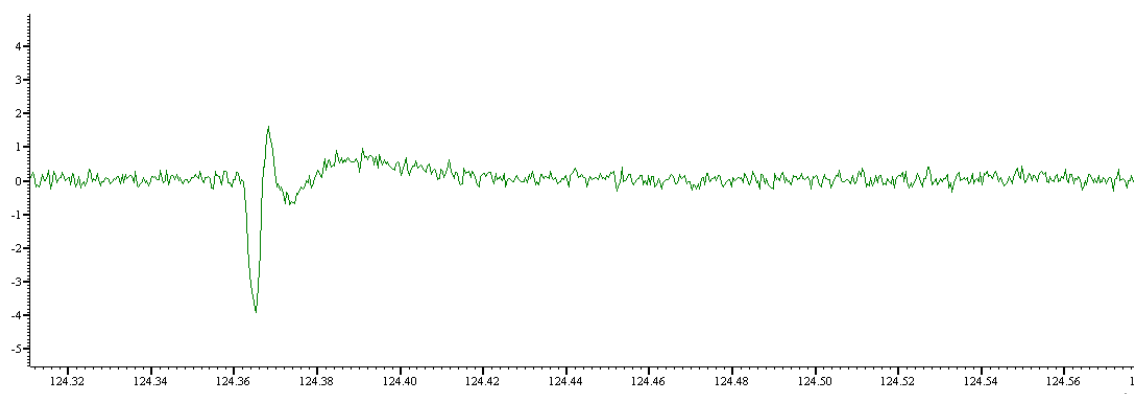
Figur 10: Et aksjonspotensial fra en mitralcelle.

Mansjettceller

Den elektriske aktiviteten som man antar stammer fra mansjettceller har en relativt større amplitude enn de enhetene som antas stammer fra mitralcellene og varigheten av aksjonspotensialet er også lengre. Aksjonspotensialet fra disse enhetene følges av en langsom monofasisk potensialforandring ca 20 ms etter aksjonspotensialet, se Figur 13. Figur 12 viser en registrering hvor det har foregått mye inhibering. Som vist på har jeg først stimulert med vann dernest med gallesaltet GLCA. Inhiberingen i dette tilfelle ser ut til å trigges av gallesaltet GLCA.



Figur 11: Registrering som viser hvordan mansjettcellene fyrer. A, B og C er ulike mansjettceller som svarer på stimuli. C ga svar i dette tilfelle med så høy amplitude at det passerte skalaen som Spike var stilt inn mot



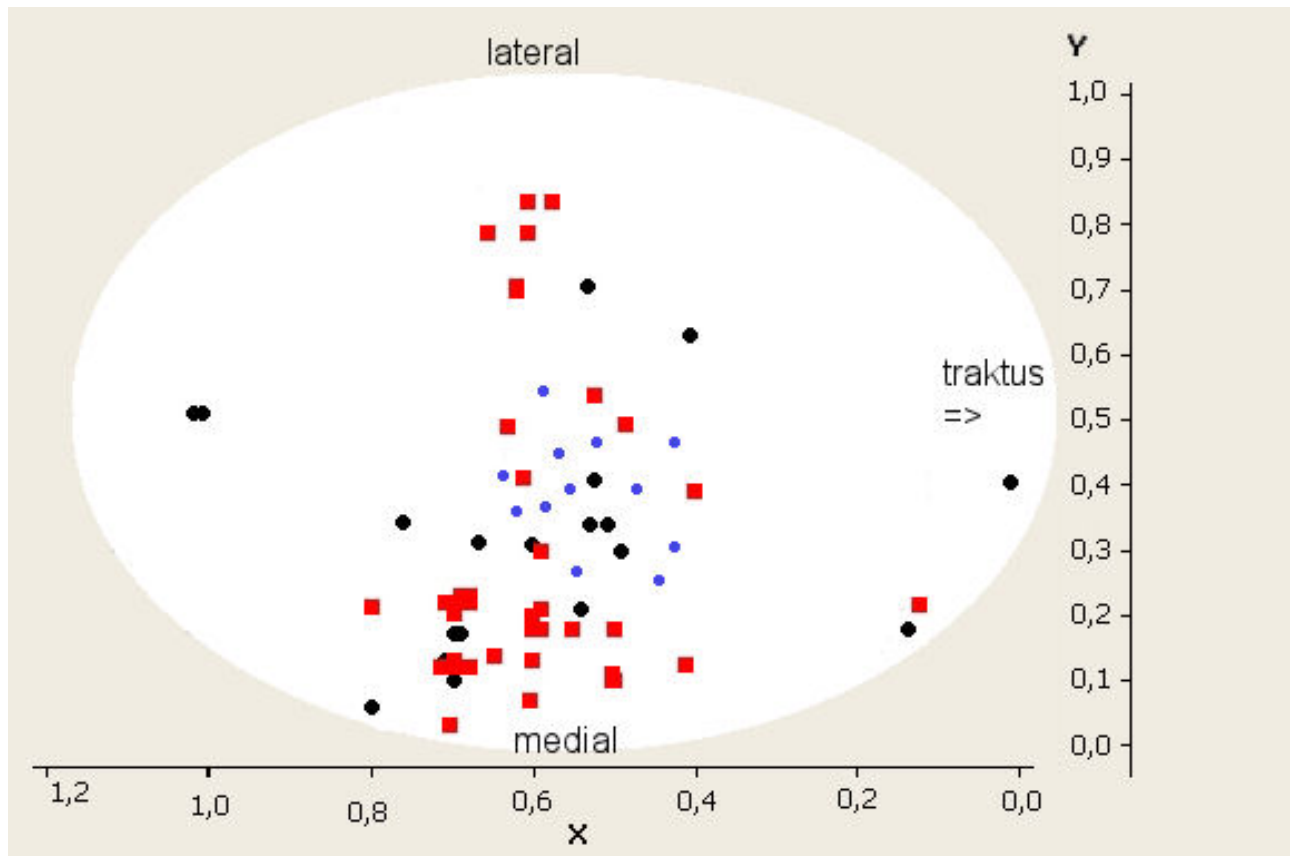
Figur 12: Et aksjonspotensial fra en mansjettcelle.

Spontant aktivitet

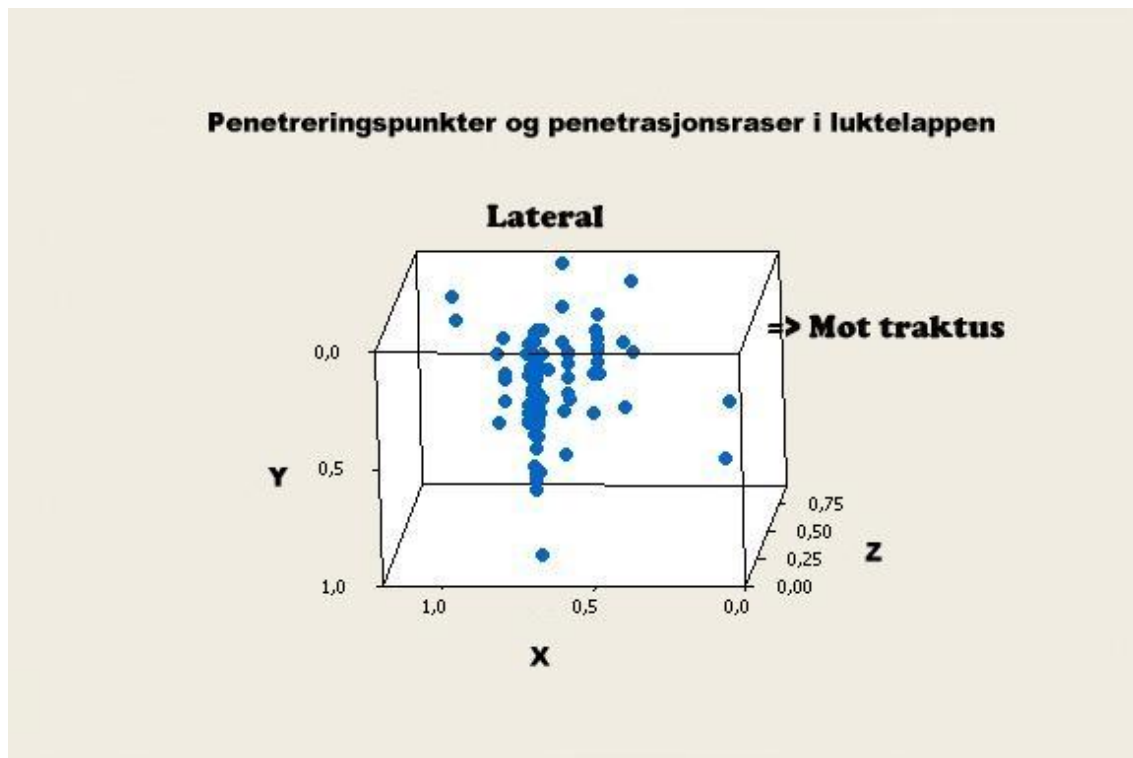
Spontantaktiviteten av de nervøse enhetene i denne delen av til luktelappen varierte i stor grad. Snittfrekvensen av aktivitet før stimulering for 20 tilfeldige valgte enheter viste at spontanaktiviteten varierte mellom 0 og 1,4 impulser per sekund over en tid på 20s.

Spesifikke områder i luktelappen gir svar på gallesalter

Jeg registrerte svar fra ulike posisjoner i luktelappen og det ble i hver penetrasjonstrasé gjort registreringer fra ulike dyp. Figur 13 viser de ulike posisjonene jeg registrerte fra på luktelappen, mens Figur 14 ytterligere viser penetrasjonsrasene fra mine 174 registreringer med stimuli av 4 gallesalter. Figuren viser plottene i dyp og gir en forestilling om penetrasjonsrasene i luktelappen.



Figur 13: Penetreringspunkter i luktelappen. De røde firkantene viser punkter for jeg har fått svar fra gallesalter, mens de svarte sirklene viser områder som ikke ga svar på gallesaltene. De blå sirklene er fra mine 74 første registreringer, hvor jeg forsøkte å finne områder hvor gallesaltene fikk



Figur 14: Penetreringspunkter og penetrasjonsrasene i luktelappen. Punktene som representer penetreringsområdene fra 174 registreringer og i hvilke dyp de er foretatt i luktelappen. X er luktelappens lengde, Y er luktelappens høyde, der overflaten har blitt satt som null pun, mens Z er luktelappens bredde.

Nevronenes svar på gallesalter

Jeg registrerte nervøs aktivitet fra 174 ulike posisjoner og dyp i luktelappen til totalt 9 karuss.

Totalt 362 nevroner svarte på stimuleringene, med en økning i nervøs frekvens. Siden jeg stimulerte med alle fire gallesaltene i alle disse registreringsposisjonene, så har jeg analysert resultatene ut i fra hvilke gallesalter som nevronene reagerte på. For eksempel så ble 12 av de 362 nevronene utelukkende stimulert av tarurolitokolsyre. Det mest potente gallesaltet var glykolitokolsyre (GLCA), som aktiverte 35 av de 362 neuronene selektivt, dvs. ca 10 %.

Totalt var det i alt 71 nevroner som svarte spesifikt på en av de fire gallesaltene.

Lukteorganet hos karuss er derfor i stand til å diskriminere mellom disse fire gallesaltene.

Tabell 3 viser hvor mange nevroner som svarte spesifikt på 1, 2, 3 og 4 stimuli, mens Tabell 4 viser hvor mange nevroner som totalt svarte på hver av de fire gallesaltene. Totalt 147 nevroner svarte på alle 4 stimuli. Dette tilsvarer ca 40 % av de 362 neuronene.

Tabell 3: Svar på gallesalter En oversikt over stimuli med 4 gallesalter. Se tekst.

Stimuli	Nevroner	%
TLCA	12	3
TCA	8	2
GLCA	35	10
GCA	16	4
GCA, GLCA	18	5
GCA, TCA	3	1
GCA, TLCA	8	2
GLCA, TCA	15	4
GLCA, TLCA	17	5
TCA, TLCA	9	2
GCA, GLCA, TCA	23	6
GCA, GLCA, TLCA	11	3
GCA, TCA, TLCA	5	1
GLCA, TCA, TLCA	35	10
GCA, GLCA, TCA, TLCA	147	40
Totalt	362	

Tabell 4: Totalt antall nevroner som svarte på hvert enkelt gallesalt.

	Nevroner	Prosent
GCA	231	23 %
GLCA	301	29 %
TCA	245	24 %
TLCA	244	24 %

Svar på fiskevann og gallesyrer

Jeg registrerte nervøs aktivitet i 33 forskjellige områder ved forskjellige dyp i luktelappen til karuss med fiskevann og gallesalter som stimuli. Dette forsøket ble gjort for å sammenligne svar på gallesalt - fiskevann. Siden min stimulusapparat kun hadde muligheter for å stimulere med maksimalt 4 stimuli, ble det benyttet 3 isteden for 4 gallesyrer, sammen med fiskevann som stimuli. For å teste svar mot alle 4 gallesaltene ble forsøkene delt i 2. Først med GLCA, TCA, TLCA og fiskevann som stimuli, deretter GCA, GLCA, TCA og fiskevann som stimuli. Den første delen av forsøket bestod av 20 registreringer hvor totalt 54 nevroner ga svar på enten fiskevann og eller gallesalter. I den andre delen av forsøket gjorde jeg 13 registreringer med GCA, GLCA, TCA og fiskevann siden svarene i andre del av forsøket var mye høyere enn ved første kjøring, ga 13 registreringer et stort nok statistisk grunnlag for å sammenligne neuronenes svar etter stimuli på lukteepitel med gallesalter - fiskevann. 90 nevroner responderte i andre del av forsøket, hvorav 13 av neuronene utelukkende svarte på fiskevann. 77 nevroner svarte på kombinasjon fiskevann og gallesalt. Tabell 5 og Tabell 6 gir en oversikt over hvilke av stimuliene som utelukkende ga svar på neuronene og informasjon om hvor mange nevroner som svarte utelukkende med gallesyre + fiskevann. Disse resultatene viser at fiskevann gir svar i de samme nevronene som de fire gallesaltene og at fiskevann er mer potent ved en konsentrasjon 10^{-7} M. Figur 15 er et eksempel på en av mine ekstracellulære registreringer der fiskevann svarer på flere nevroner.

Tabell 5: Fiskevann og galle

20 registreringer med fiskevann og 3 gallesyrer som luktstimuli

Stimuli	Antall nevroner
Fiskevann (FV)	32
GLCA	3
TCA	1
TLCA	0
GLCA, FV	5
TCA, FV	4
TLCA, FV	0
GLCA, TCA	0
TCA, TLCA	1
GLCA, TLCA	0
GLCA, TCA, TLCA	2
GLCA, TCA, FV	3
TCA, TLCA, FV	2
GLCA, TLCA, FV	0
GLCA, TCA, TLCA, FV	1
Antall neuroner	54

Tabell 6: Fiskevann og galle 2

13 registreringer med fiskevann og 3 gallesyrer som luktstimuli

Stimuli	Antall nevroner
Fiskevann (FV)	13
GCA	0
GLCA	0
TCA	0
GCA, FV	3
GLCA, FV	2
TCA, FV	5
GCA, GLCA	0
GCA, TCA	0
GLCA, TCA	0
GCA, GLCA, TCA	0
GCA, GLCA, FV	3
GCA, TCA, FV	4
GLCA, TCA, FV	3
GCA, GLCA, TCA, FV	57
Antall neuroner	90

Effekt av fiskevann og galle

I en serie med forsøk har jeg stimulert med fiskevann fra to ulike karuss og galle tatt fra de samme fiskene (se metodekapitlet). Begge fiskene var hanner. Jeg registrerte fra 28 ulike posisjoner og analyserte svar fra 68 nevroner. Mine resultater viser ingen diskriminering etter stimuli med galle - galle og fiskevann - fiskevann. Derimot kan mine resultater antyde en diskriminering mellom fiskevann – galle. Disse dataene blir tolket videre i diskusjon.

Tabell 7 gir en oversikt over nevronenes svar på fiskevann og galle. Figur 16 viser eksempel på ekstracellulær registrering med fiskevann og galle som stimulus.

Tabell 7: Nevronenes svar på fiskevann og galle. V1 og V2, fiskevann fra henholdsvis fisk 1 og fisk 2. G1 og G2, galle fra henholdsvis fisk 1 og fisk 2.

Stimulus	Antall nevroner
V2	2
V1	3
G1	1
G2	1
V1_V2	18
V1_G2	1
V1_G1	0
V2_G1	0
V2_G2	2
G2_G1	0
V1_V2_G1	9
V1_V2_G2	6
V1_G1_G2	2
V2_G1_G2	0
V1_V2_G1_G2	23
Totalt	68

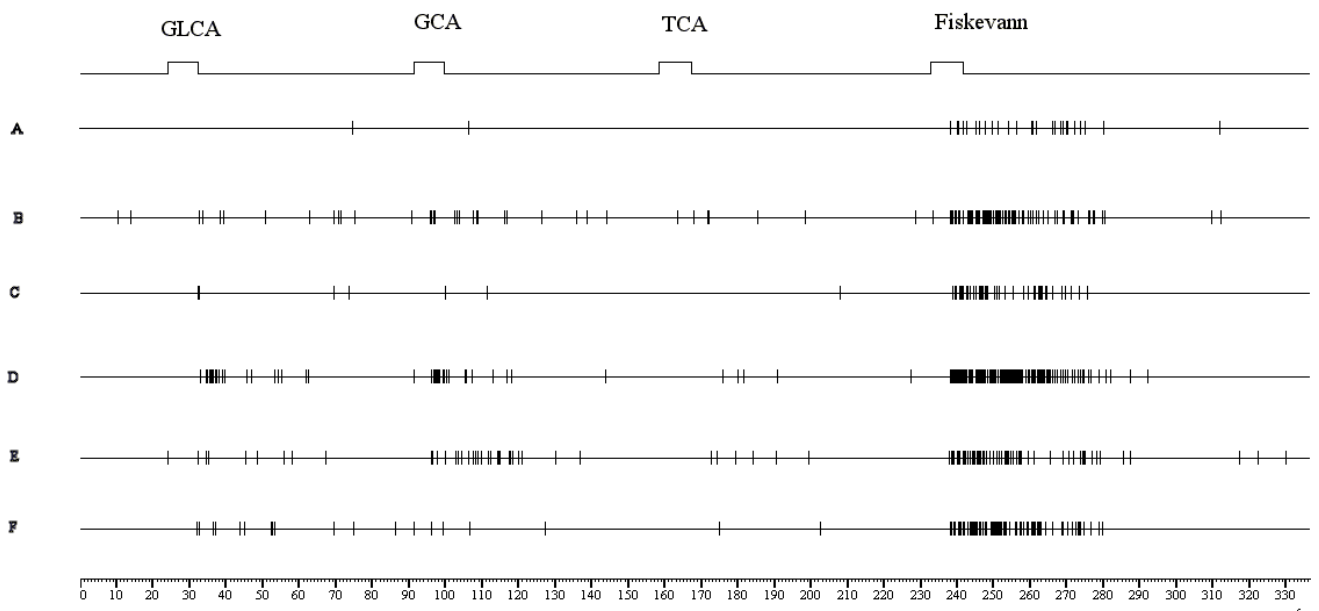
Nervøs aktivitet utløst ved ulike konsentrasjoner

Jeg registrerte nervøs aktivitet fra 16 ulike posisjoner i luktelappen hos 3 karuss under stimulering med glykolitokolsyre i fortynningene 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} og 10^{-7} M. Av 105 nevroner reagerte alle på den høyeste konsentrasjonen og 50 av dem på den laveste konsentrasjonen, se Tabell 8. Figur 17 viser eksempel på ekstracellulær registrering med ulike konsentrasjoner av GLCA.

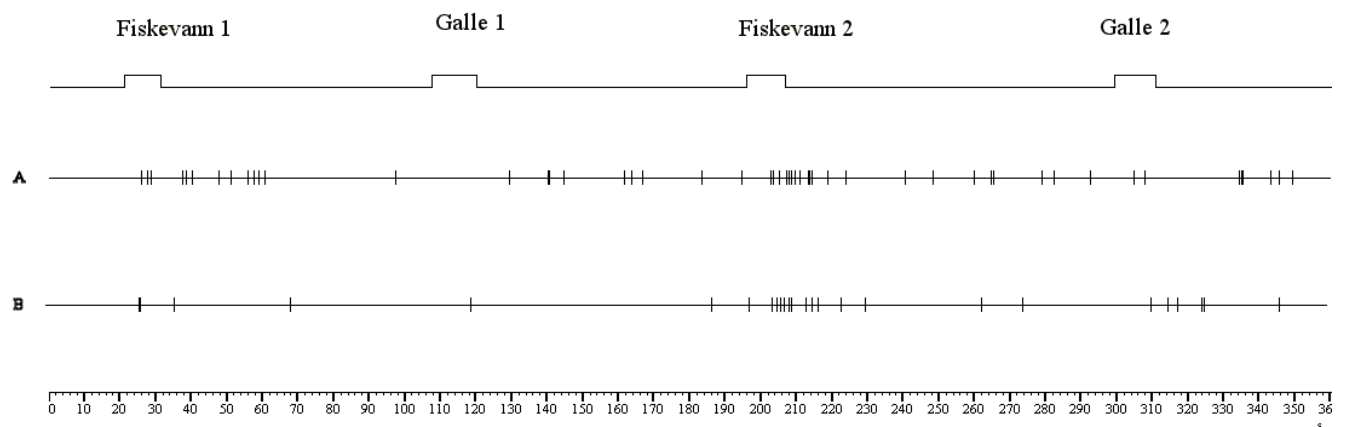
Tabell 8: Forsøk med ulike konsentrasjoner.

Antall nevroner som ga svar ved ulike konsentrasjoner av gallesaltet GLCA.

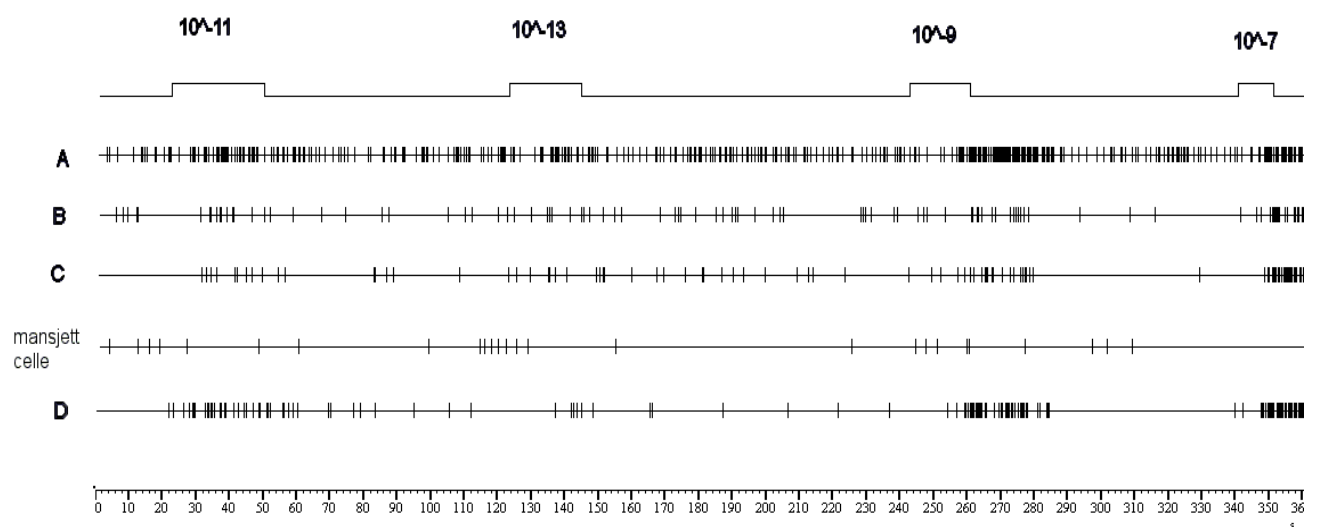
10^{-13} M	10^{-11} M	10^{-9} M	10^{-7} M
3	4	8	8
1	0	4	5
2	3	4	5
4	4	5	7
6	5	7	9
8	6	8	8
5	6	7	8
4	6	9	9
3	5	5	7
3	4	5	5
	1	3	8
2	2	3	7
3	3	4	4
4	4	4	4
1	3		5
		2	2
1	2	4	4
50	58	82	105



Figur 15: Eksempel på ekstracellulær registrering i den mediale delen av luktelappen, der lukteepitelet har blitt stimulert med Glykokolitokolsyre (GLCA), Glykokolsyre (GCA), Taurokolsyre (TCA) og fiskevann



Figur 16:Eksempel på ekstracellulær registrering i den mediale delen av luktelappen, der lukteepitelet har blitt stimulert med galle og fiskevann.



Figur 17:Eksempel på ekstracellulær registrering i den mediale delen av luktelappen, der lukteepitelet har blitt stimulert med ulike konsentrasjoner av GLCA. ABCD er ulike mitralceller som gir svar, mens m antagelig er en mansjettcelle

DISKUSJON

I denne oppgaven har jeg registrert nervøs aktivitet fra enkelte nevroner i luktelappen med mikroelektroder. Hensikten var å finne frem til områder i luktelappen hvor cellene reagerte på gallesalter, dvs. om det er noe område som er spesifikt følsomt for gallesalter. Jeg har studert den nervøse aktiviteten til nevronene i dette området for å kunne bestemme om de diskriminerer mellom fire ulike gallesalter. Videre har jeg undersøkt om nevronene reagerer på “fiskevann” og galle fra fisk. Til slutt har jeg gjort forsøk med ulike konsentrasjoner av et gallesalt, glykolutokolsyre for å gi en antydning om følsomheten til nevronene i denne delen av luktelappen. De første 74 registreringene foregikk med hensyn på lokalisering av nevroner som svarte på gallesaltene. Siden jeg kun fikk svar på gallesaltene fra nevroner i den mediale delen av luktelappen, fortsatte jeg de resterende registreringene i dette området i luktelappen. I det følgende vil jeg diskutere mine funn i lys av tidligere studier.

Metoder

Registreringene som ble gjort i en enkelt posisjon av luktelappen ble gjenstand for en analyse med hjelp av softwareprogrammet Spike 3.0. Resultatene av denne analysen gjorde at man kunne skille mellom flere ulike typer aksjonspotensialer med hensyn på de nervøse enhetenes form og amplitude. Dette verktøyet var derfor essensielt for min forståelse av hvordan de enkelte enhetene oppførte seg i forhold til stimulus. Analysens effektivitet kunne kontrolleres med funksjonen ”overlay” som viser alle aksjonspotensialene sortert etter bestemte kriterier blir overlappet. Noen registreringer har vært vanskelig å analysere. Dette kan ha gitt feiltolkning av data, spesielt når det gjelder terskelstudiene hvor mange av registreringene har vist en svak frekvensøkning under stimuleringen samtidig som støyen i registreringene har vært relativ stor. En registrering med mye støy og liten frekvensøkning under stimulering, kan ha blitt tolket som svar, dersom spontanaktiviteten har vært uregelmessig. Likeledes kan et svar fra et neuron ha blitt oversett dersom spontanaktiviteten har vært for stor. Det er videre en mulighet for at jeg kan ha avgrenset og tolket aksjonspotensialene upresist. Formen og amplituden til hvordan aksjonspotensialene Spike skal lete etter, stiller man selv inn via et grafisk grensesnitt. En slik manuell avgrensning som baserer seg på at alle aksjonspotensial mer eller mindre er like, og videre tolkning av analyseringen til Spike øker muligheten for å gjøre feilmålinger.

Kjemotopi

Thommesen (1978) viste med overflateregistreringer at fiskevann ga svar i luktelappen hos røye og at det ble størst svar i den rostrale og mediale delen av luktelappen. Analoge studier gjort på røye og harr, viste at gallesyrer og aminosyrer ga svar i ulike deler av luktelappen (Døving *et al.*, 1980). Gallesyrene ga en svar i den mediale delen av luktelappen, mens aminosyrene i hovedsak ga svar på den laterale delen av luktelappen. Av 248 registreringer ble 174 registreringer i hovedsak foretatt i den mediale delen av luktelappen, mens 74 registreringer hovedsakelig ble foretatt i andre deler av luktelappen. Av de 74 første registreringene svarte 10 nevroner på et eller flere gallesalter, mens 362 nevroner ga svar på et eller flere gallesalter i de påfølgende 174 registreringene.

Diskriminasjon av kjente gallesalter

Thommesen (1978) var den første som fant at ulike lukst substanser induiserte ulike svar i luktelappen. Hans resultater viste at sansecellene reagerte forskjellig på lukst substansene og projiserte til ulike deler av luktelappen. Således gir gallesalter svar i den mediale del av luktelappen hos laksefisk, mens aminosyrer gir svar i de laterale delene. Disse resultatene har senere blitt bekreftet hos andre benfisk (Døving *et al.*, 1980; Hara & Zhang, 1996; Friedrich & Korsching, 1997; Nikonov & Caprio, 2001). Forsøk med såkalt kryssadaptasjon har vist at sulfaterte og ikke-sulfaterte gallesyre sannsynligvis representerer forskjellige lukter for hunner av sjøniøye *Petromyzon marinus* (Siefkes & Li, 2004). Imidlertid har ingen undersøkt hvorledes de enkelte nevronene i luktelappen reagerer på gallesalter og om cellene kan diskriminere ulike gallesalter. Jeg har undersøkt om neuronene i luktelappen kunne skille mellom 4 ulike gallesalter. Av 362 nevroner svarte 19 % utelukkende på en av de fire gallesaltene, ca 40 % svarte på kombinasjoner med 2 og 3 av de 4 gallesaltene og ca 40 % av neuronene svarte på alle 4 stimuliene. Av de fire gallesaltene induiserte glykolitokolsyre oftest svar i luktelappens nevroner og 10 % av nevronene ga svar ved stimulering med dette gallesaltet. Mine funn viser at nevroner i karussens luktelapp diskriminerer mellom de 4 ulike gallesaltene som ble benyttet.

Diskriminasjon av fiskevann

Mine resultater med *fiskevann* tatt fra 2 ulike fisk ga ingen indikasjon på at fiskenes nevroner i luktelappen kunne skille mellom vannene. En mulig konklusjon er at ulike individer av karuss ikke har gallesalter som gjør at de kan skilles fra hverandre med hjelp av luktesansen.

Diskriminasjon av fiskevann og galle

Mine resultater med stimulering med *fiskevann og galle* viste ingen diskriminering av galle - galle og fiskevann - fiskevann. Derimot kunne mine resultater antyde en diskriminering mellom fiskevann – galle. Denne diskrimineringen kan enten skyldes at fiskevannet inneholder andre substanser enn galle og dermed kan frembringe svar på andre nevroner, eller at fiskevannet hadde en høyere konsentrasjon av gallestimuli.

Fiskevannet ble uten noen form for fortynninger benyttet til direkte stimuli på lukteepitelet til testfiskene. Galleløsningen ble tatt fra de samme fiskene som fiskevannet ble laget fra, men fortynnet til en konsentrasjon som var $5 \cdot 10^{-11}$ g/L. Dette tilsvarer en teoretisk konsentrasjon på 10^{-13} M, beregnet ut ifra en molekylvekt på 500. Konsentrasjon på fiskevannet ble ikke forsøkt målt og det er derfor heller ikke mulig å sammenligne konsentrasjonene direkte, annet ved å henvise til mine data som viser at ca dobbelt så mange nevroner svarte etter stimuli fra galle sammenlignet med stimuli fra fiskevann. Dette er også sammenfallende med mine resultater at ved de lave konsentrasjonene er det få nevroner som svarer.

Studier av ulike konsentrasjoner

Gallesubstanser er som nevnt potente luktestimuli for fisk (Døving *et al.*, 1980; Thommesen, 1982, 1983). Ut fra registreringer fra luktelappens overflate på laksefisk under stimulering med gallesalter og aminosyrer kunne man vise at gallesaltene var ca. 1000 ganger mer potent enn aminosyrene (Døving *et al.*, 1980). Jeg benyttet glykolitokolsyre som stimulus i fortynningene 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} og 10^{-13} M. Totalt svarte 105 nevroner på den høyeste konsentrasjonen, 10^{-7} og ca halvparten av disse svarte også på den laveste konsentrasjonen.

I enkelte av mine registreringer, startet jeg med den høyeste konsentrasjonen for å se om jeg hadde nevroner som ville gi svar på mine stimuli. Eventuelle rester fra gallesaltene kunne ha festet seg på innsiden av stimuleringsslangene og blitt frigjort ved andre stimuleringer. I terskelstudier bør det være en god praksis å starte med den laveste konsentrasjon for å unngå påvirkning fra de sterkere konsentrasjonene, men jeg tror likevel det er liten sannsynlighet for at stimuleringsrekkefølgen skulle ha noen betydning. Jeg utførte i alt 16 registreringer og forsøkene burde vært gjort 3 ganger dette antall med lavest mulig konsentrasjon for å vise noen sikre data om terskelverdiene til gallesalter. Mine data kan dermed ikke annet en å antyde at terskelverdien for svar på glykolitokolsyre trolig er lavere enn 10^{-13} M.

KONKLUSJON

1. Det finnes spesifikke områder i luktelappen som svarer på gallesalter
2. Nevroner i luktelappen hos karuss kan diskriminere mellom de fire gallesaltene (GCA, GLCA, TCA og TLCA) jeg benyttet som stimuli.
3. Fiskevann er et potent luktstimulus og utløser svar på de samme neuronene som svarer på gallesalter. Det er derfor trolig at fiskevann inneholder gallesalter eller gallesaltlignende strukturer.
4. Fiskevann er et mer potent luktstimulus enn gallesalter ved 10^{-7} M..
5. Fiskevann og galle utløser ulike svar i luktelappen. Årsaken til ulikheten kan skyldes konsentrasjonsforskjeller

REFERANSER

- ALONSO, J. R., COVEÑAS, R., MIGUEL, J. J. & AIJÓN, J. (1988). Two types of mitral cells in the teleostean olfactory bulb. *Neurosci Res commun* **3**, 113-118.
- ALONSO, J. R., LARA, J., MIGUEL, J. J. & AIJÓN, J. (1987). Ruffed cells in the olfactory bulb of freshwater teleosts. I. Golgi impregnation. *J Anat* **155**, 101-107.
- AREVALO, R., ALONSO, J. R., LARA, J., BRINON, J. G. & AIJÓN, J. (1991). Ruffed cells in the olfactory bulb of freshwater teleosts. II. A Golgi/EM study of the ruff. 477-484.
- BJERSELIUS, R., LI, W., TEETER, J., JOHNSEN, P., MANIAK, P., GRANT, G., POLKINGHORNE, C. & SORENSEN, P. (2000). Direct behavioural evidence that unique bile acids released by larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*) function as a migratory pheromone. *Can J Fish Aquat Sci* **57**, 557-569.
- BREIPOHL, W., BIJVANK, G. L. & ZIPPERL, H. P. (1973). Rastermikroskopische undersuchungen der olfaktorischen rezeptoren im riechepithel. *Z. Zellforsch* **138**, 439-454.
- CLAUSØN FRIIS, P. (1599). In: Samlede skrifter av Peder Clausøn Friis (ed. G. Storm), Christiania, 1881. 111-118.
- DENTON, J. E., YOUSEF, M. K., YOUSEF, I. M. & KUKSIS. (1974). Bile acid composition of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Lipids* **9**, 945-951.
- DØVING, K. B., ENGER, P. S. & NORDENG, H. (1973). electrophysiological studies on the olfactory sense in char (*Salmo alpinus* L.). *Comp Biochem Physiol A* **45**, 21-24.
- DØVING, K. B. & GEMNE, G. (1966). An electrophysiological study of the efferent olfactory system in the burbot. *J Neurophysiol* **29**, 665-674.
- DØVING, K. B., NORDENG, H. & OAKLER, B. (1974). Single unit discrimination of fish odours released by char (*Salmo alpinus* L.) populations. *Comp Biochem Physiol A* **47**, 1051-1063.
- DØVING, K. B., SELSET, R. & THOMMESEN, G. (1980). Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes. *Acta Physiol Scand* **108**, 123-131.
- DØVING, K. B. & THOMMESEN, G. (1977). Some properties of the fish olfactory system. In: *Olfaction and Taste. Edited by J. LeMagnen and P. McLeod. Information Retrival, London-Washington VI*, 175-183.
- FINGER, T. E. (1975). The distribution of the olfactory tracts in the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* **161**, 125-141.
- FRIEDRICH, R. W. & KORSCHING, S. I. (1997). Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* **18**, 737-752.
- GEMNE, G. & DØVING, K. B. (1969). Ultrastructural properties of primary olfactory neurons in fish (*Lota lota* L.). *Am J Anat* **126**, 457-475.
- GROVES, A. B., COLLINS, G. B. & TREFETHEN, P. S. (1968). Roles of olfaction and vision in choice of spawning site by homing adult chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Fish Res Bd Canada* **25**, 867-876.
- HAGEY, L. R. (1992). Bile acid biodiversity in vertebrates: chemistry and evolutionary implication. Ph.D. Dissertation. University of California, San Diego, San Diego, CA.
- HAMDANI, E. H., ALEXANDER, G. & DØVING, K. B. (2001a). Projection of sensory neurons with microvilli to the lateral olfactory tract indicates their participation in feeding behaviour in crucian carp. *Chem Senses* **26**, 1139-1144.
- HAMDANI, E. H., KASUMYAN, A. & DØVING, K. B. (2001b). Is feeding behaviour in crucian carp mediated by the lateral olfactory tract? *Chem Senses* **26**, 1133-1138.

- HAMDANI, E. H., STABELL, O. B., ALEXANDER, G. & DØVING, K. B. (2000). Alarm reaction in the crucian carp is mediated by the medial bundle of the medial olfactory tract. *Chem Senses* **25**, 103-109.
- HAMDANI EL, H. (2000). Alarm reaction in the cruican carp *Carassius carassius*. *Thesis for the Degree of Cand. Scient.*
- HAMDANI EL, H. (2003). The functional organization of the olfactory system in the crucian carp *Carassius carassius*. *Thesis presented for the degree of DOCTOR SCIENTARIUM UNIV. OF OSLO.*
- HAMDANI EL, H. & DØVING, K. B. (2002). The alarm reaction in crucian carp is mediated by olfactory neurons with long dendrites. *Chem Senses* **27**, 395-398.
- HAMDANI EL, H. & DØVING, K. B. (2003). Sensitivity and selectivity of neurons in the medial region of the olfactory bulb to skin extract from conspecifics in crucian carp, *Carassius carassius*. *Chem Senses* **28**, 181-189.
- HANSEN, A., ELLER, P., FINGER, T. E. & ZEISKE, E. (1997). The crypt cell; a microvillous ciliated olfactory receptor cell in teleost fishes. *Chem. Senses* **22**, 694-695.
- HANSEN, A. & FINGER, T. E. (2000). Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes. *Brain Behav Evol* **55**, 100-110.
- HANSEN, A., ZIPPEL, H. P., SORENSEN, P. W. & CAPRIO, J. (1999). Ultrastructure of the olfactory epithelium in intact, axotomized, and bulbectomized goldfish, *Carassius auratus*. *Microsc Res Tech* **45**, 325-338.
- HARA, T. J. & ZHANG, C. (1996). Spatial projections to the olfactory bulb of functionally distinct and randomly distributed primary neurons in salmonid fishes. *Neurosci Res* **26**, 65-74.
- HARDISTY, M. & POTTER, I. (1971). The general biology of adult lampreys. In: *Hardisty MW, Potter IC (eds) The Biology of lampreys*, Academic Press, New York **vol. 1**, 127-206.
- HASLER, A. (1968). Underwater guideposts; Homing of salmon. *Univ. Wisconsin Press, Madison*, 155 pp.
- HASLER, A., SCHOLZ, A. T. & HORRALL, R. M. (1978). Olfactory imprinting and homing in salmon. *Am Sci* **66**, 347-355.
- HASLEWOOD, G. A. & TOKES, L. (1969). Comparative studies of bile salts. Bile salts of the lamprey *Petromyzon marinus* L. *Biochem J* **114**, 179-184.
- HASLEWOOD, G. A. D. (1967a). Bile salt evolution. *J Lipid Res* **8**, 535-550.
- HASLEWOOD, G. A. D. (1967b). Bile salts. Methuen. *Methuen, London*.
- HASLEWOOD, G. A. D. (1978). The biological importance of bile salts. *North-Holland, Amsterdam*.
- HELLSTROM, T. & DØVING, K. B. (1986). Chemoreception of taurocholate in anosmic and sham-operated cod, *Gadus morhua*. *Behav Brain Res* **21**, 155-162.
- HILDEBRAND, J. G. & SHEPHERD, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci* **20**, 595-631.
- HOFMANN, A. F. (1999). In *The Liver: Biology and Pathology* (eds Arias, I. M. et al.), Raven Press, New York, 1994, 3rd edn; Hofmann, A. F. *News Physiol. Sci.* **14**, p. 677.
- HOFMANN, A. F., C. D. SCHTEINGART, AND L. R. HAGEY. (1995). Species differences in bile acid metabolism. In *Bile Acids and Liver Diseases* (International Falk Workshop). G. Paumgartner, U. Beuers, editors. Kluwer Academic. *Publishers, Boston*. **3-30**.
- HOLL, A. (1965). Vergleichende morphologische und histologische Untersuchungen am Geruschorgan der Knochenfische. *Z Morph Ökol Tiere* **54**, 707-782.

- HOLMGREN, N. (1920). Zur Anatomie und Histologie des vorder- und Zwischenhirns der Knochenfische. *Acta Zool (Stockh)* **1**, 137-315.
- HUBEL, D. H. (1957). Tungsten microelectrode for recording from single units. *Science* **125**.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cats visual cortex. . *J. Physiol.* **160**, 106-154.
- ICHIKAWA, M. & UEDA, K. (1977). Fine structure of the olfactory epithelium in the goldfish, *Carassius auratus*. A study of retrograde degeneration. *Cell Tissue Res* **183**, 445-455.
- KOSAKA, T. (1980). Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*): II. Fine structure of the ruffed cell. *J Comp Neurol* **193**, 119-145.
- KOSAKA, T. & HAMA, K. (1979). Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*) I. Golgi impregnation and serial thin sectioning studies. *J Comp Neurol* **186**, 301-319.
- KOSAKA, T. & HAMA, K. (1981). Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). III. Three-dimensional structure of the ruffed cell dendrite. *J Comp Neurol* **201**, 571-587.
- KOSAKA, T. & HAMA, K. (1982). Synaptic organization in the teleost olfactory bulb. 707-719.
- KRASOWSKI, M. D., YASUDA, K., HAGEY, L. R. & SCHUETZ, E. G. (2005). Evolution of the pregnane X receptor: adaptation to cross-species differences in biliary bile salts.
- LI, W., SCOTT, A. P., SIEFKES, M. J., YAN, H., LIU, Q., YUN, S. S. & GAGE, D. A. (2002). Bile Acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. *Science* **296**, 138-141.
- LI, W. & SØRENSEN, P. W. (1997). Highly independent olfactory receptor sites for naturally occurring bile acids in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *J Comp Physiol A* **180**, 429-438.
- LI, W., SØRENSEN, P. W. & GALLAHER, D. D. (1995). The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to unique bile acids released by conspecific larvae. *J Gen Physiol* **105**, 569-587.
- MOMBAERTS, P., WANG, F., DULAC, C., CHAO, S. K., NEMES, A., MENDELSON, M., EDMONDSON, J. & AXEL, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-686.
- NIKONOV, A. A. & CAPRIO, J. (2001). Electrophysiological evidence for a chemotopy of biologically relevant odors in the olfactory bulb of the channel catfish. *J Neurophysiol* **86**, 1869-1876.
- NORDENG, H. (1971). Is the local orientation of anadromous fishes determined by pheromones? *Nature* **233**, 411-413.
- NORDENG, H. (1977). A pheromone hypothesis for homeward migration in anadromous salmonids. *Oikos* **28**, 155-159.
- NORTHCUTT, R. G. & DAVIS, R. E. (1983). telencephalic organization in ray-finned fishes. *In Fish Neurobiology* **2**, 203-236.
- OLSÉN, K. H. (1987). Chemoattraction of juvenile Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) , to water scented by conspecific intestinal content and urin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **87A**, 641-643.
- PFEIFFER, W. (1963). The morphology of the olfactory organ of the pacific salmon(*Oncorhynchus*). *Can J zool* **41**, 1233-1236.

- POLKINGHORNE, C. N., OLSON, J. M., GALLAHER, D. G. & SORESENSEN, P. W. (2001). Larval sea lamprey release two unique bile acids** to the water at a rate sufficient to produce detectable riverine pheromone plumes. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**, 15-30.
- RESSLER, K. J., SULLIVAN, S. L. & BUCK, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245-1255.
- RETZIUS, G. D. E. D. R. (1894). In Biologisches Untersuchungen. Samson & Wallin, Stockholm. . 25 -28.
- ROONEY, D., DØVING, K. B., RAVAILLE-VERON, M. & SZABO, T. (1992). The central connections of the olfactory bulbs in cod, *Gadus morhua* L. 63-75.
- SELSET, R. & DØVING, K. B. (1980). Behaviour of mature anadromous char (*Salmo alpinus* L.) towards odorants produced by smolts of their own population. *Acta Physiol Scand* **108**, 113-122.
- SHELDON, R. E. (1912). The olfactory tracts and centers in teleosts. *J Comp Neurol* **22**, 177-339.
- SIEFKES, M. J. & LI, W. (2004). Electrophysiological evidence for detection and discrimination of pheromonal bile acids by the olfactory epithelium of female sea lampreys (*Petromyzon marinus*). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **190**, 193-199. Epub 2003 Dec 2020.
- SLEIGH, M. A., BLAKE, J. R. & LIRON, N. (1988). The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* **137**, 726-741.
- STABELL, O. B. (1986). Intraspecific pheromone discrimination and substrate marking by Atlantic salmon parr. *J. Chem. Ecol.* **13**, 1625-1643.
- STABELL, O. B., SELSET, R. & SLETTEN, K. (1982). A comparative chemical study on population specific odorants from Atlantic salmon. *J. Chem. Ecol.* **8**, 201-217.
- THOMMESEN, G. (1978). The spatial distribution of odour induced potentials in the olfactory bulb of char and trout (Salmonidae). *Acta Physiol Scand* **102**, 205-217.
- THOMMESEN, G. (1982). Specificity and distribution of receptor cells in the olfactory mucosa of char (*Salmo alpinus* L.). *Acta Physiol Scand* **115**, 47-56.
- THOMMESEN, G. (1983). Morphology, distribution, and specificity of olfactory receptor cells in salmonid fishes. *Acta Physiol Scand* **117**, 241-249.
- UNE, M., GOTO, T., KIHARA, K., KURAMOTO, T., HAGIWARA, K., NAKAJIMA, T. & HOSHITA, T. (1991). Isolation and identification of bile salts conjugated with cysteinolic acid from bile of the red seabream, *Pagrosomus major*. *J Lipid Res* **32**, 1619-1623.
- VASSAR, R., CHAO, S. K., SITCHERAN, R., NUNEZ, J. M., VOSSHALL, L. B. & AXEL, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* **79**, 981-991.
- VERMEIRSSSEN, E. L. M. & SCOTT, A. P. (2001). Male priming pheromone is present in bile, as well as urine, of female rainbow trout. *J Fish Biol*, 1039–1045.
- VON BARTHELD, C. S., MEYER, D. L., FIEBIG, E. & EBBESSON, S. O. (1984). Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. 475-487.
- VRIEZE, L. & SORESENSEN, P. W. (2001). Laboratory assessment of the role of a larval pheromone and natural stream odor in spawning stream localization by migratory sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Can J Fish Aquat Sci* **58**, 2374–2385.
- WANG, F., NEMES, A., MENDELSON, M. & AXEL, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* **93**, 47-60.
- WELTZIEN, F. A., HOGLUND, E., HAMDANIEL, H. & DOVING, K. B. (2003). Does the lateral bundle of the medial olfactory tract mediate reproductive behavior in male crucian carp? *Chem Senses* **28**, 293-300.

- WISBY, W. J. H., A. D. (1954). Effect of olfactory occlusion on migrating silver salmon (O. Kisutch). *J. Fish Res Bd Canada* **11**.
- YAMAMOTO, M. (1982). comparative morphology of the peripheral olfactory organ in teleosts. *In Chemoreception in Fishes. ed, Hara, T.J., Elsevier, Amsterdam.*
- YUN, S.-S., SCOTT, A. P. & LI, W. (2003). Pheromones of the male sea lamprey, *Petromyzon marinus* L.: structural studies on a new compound, 3-keto allocholic acid, and 3-keto petromyzonol sulfate., pp. 297-304.
- ZHANG, C., BROWN, S. B. & HARA, T. J. (2001). Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals. *J Comp Physiol [B]* **171**, 161-171.
- ZIPPEL, H. P., RESCHKE, C. & KORFF, V. (1999). Simultaneous recordings from two physiologically different types of relay neurons, mitral cells and ruffed cells, in the olfactory bulb of goldfish. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**, 327-337.